

# PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 16 September 1999 (16.09.99)	
International application No.: PCT/JP99/01223	Applicant's or agent's file reference: SEN-002PCT
International filing date: 12 March 1999 (12.03.99)	Priority date: 12 March 1998 (12.03.98)
Applicant: KARUBE, Isao et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
24 August 1999 (24.08.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--



## PATENT COOPERATION TREA

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building 6F  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 29 May 2000 (29.05.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference SEN-002PCT	
International application No. PCT/JP99/01223	International filing date (day/month/year) 12 March 1999 (12.03.99)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address SAITOH, Takashi Laionzumanshon nishinippori Dai 2 42-2-1002, Nishinippori 1-chome Arakawa-ku Tokyo 116-0013 Japan (applicant and inventor for all designated States)	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address SAITOH, Takashi Laionzumanshon nishinippori Dai 2 42-2-1002, Nishinippori 1-chome Arakawa-ku Tokyo 116-0013 Japan (applicant for US and inventor for all designated States)	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Shinji IGARASHI Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building 6F  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 29 May 2000 (29.05.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference SEN-002PCT	
International application No. PCT/JP99/01223	International filing date (day/month/year) 12 March 1999 (12.03.99)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant    ☒ the inventor    ☐ the agent    ☐ the common representative

Name and Address KARUBE, Isao 3-16, Higashiarima 1-chome Miyamae-ku Kawasaki-shi Kanagawa 216-0002 Japan (applicant and inventor for all designated States)	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person    ☐ the name    ☐ the address    ☐ the nationality    ☐ the residence

Name and Address KARUBE, Isao 3-16, Higashiarima 1-chome Miyamae-ku Kawasaki-shi Kanagawa 216-0002 Japan (applicant for US and inventor for all designated States)	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  <b>Shinji IGARASHI</b> Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building 6F  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 29 May 2000 (29.05.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference SEN-002PCT	
International application No. PCT/JP99/01223	International filing date (day/month/year) 12 March 1999 (12.03.99)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD. Shin-Marunouchi Building 5-1, Marunouchi 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-0005 Japan (for all designated States except US)	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: <b>The person in Box 2 should be included in the record as an applicant for all designated States except US.</b>		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Shinji IGARASHI Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---





PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 SEN-002PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/01223	国際出願日 (日.月.年) 12.03.99	優先日 (日.月.年) 12.03.98
出願人(氏名又は名称) 軽部 征夫		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1の国際調査機関に意見を提出することができる。

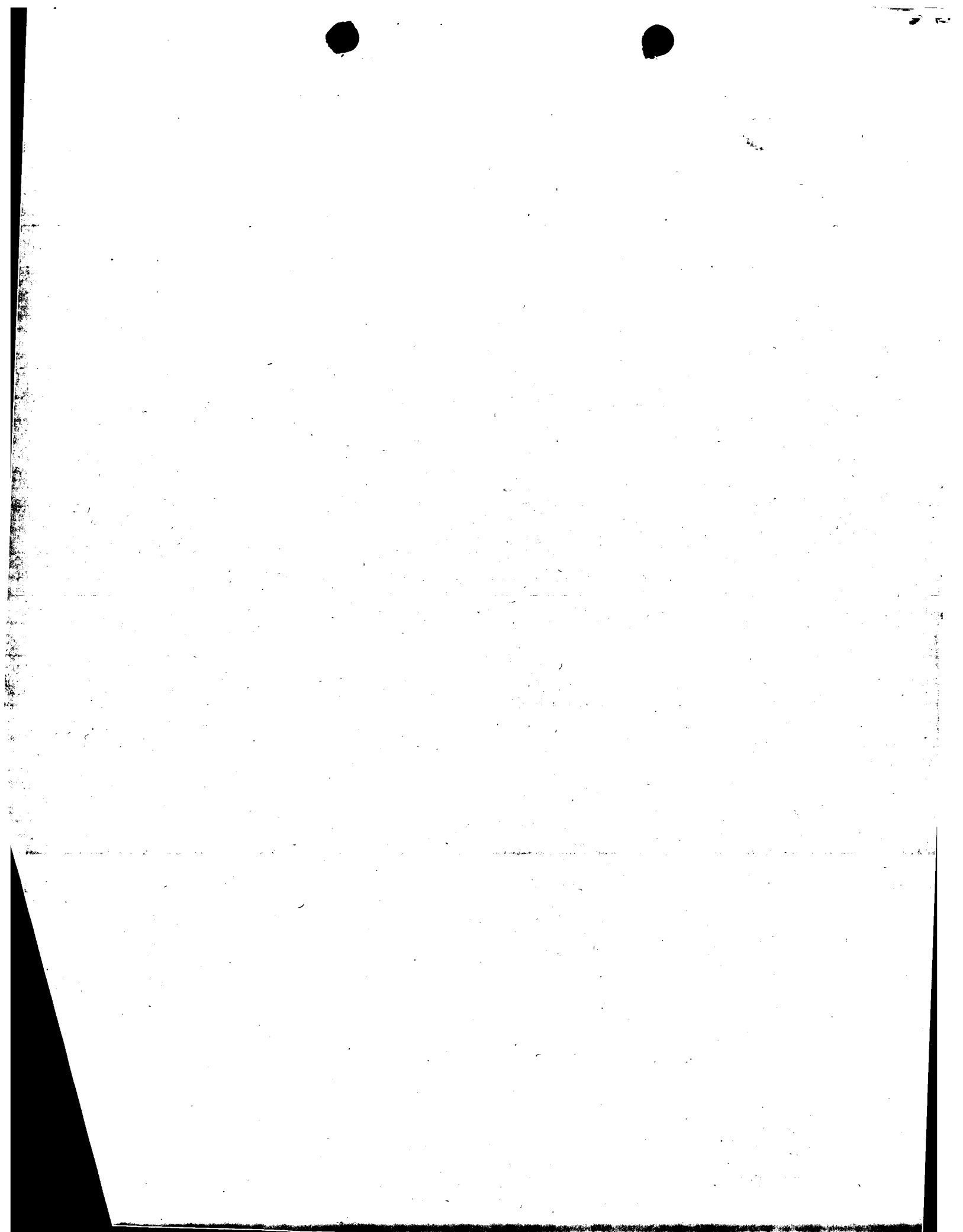
6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12M1/00, C12N5/06

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12M1/00, C12N5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GB, 2209468, A (The University of Salford) 17. 5月. 1989 (17. 05. 89) 第6頁、第16-18頁 (ファミリーなし)	1-20
A	JP, 60-83583, A (理化学研究所) 11. 5月. 1985 (11. 05. 85) 全文, 第1, 4, 5図 & EP, 137504, A & JP, 60083584, A & EP, 137504, B & JP, 87007837, B & JP, 87007838, B & DE, 3483934, G & US, 5013660, A & CA, 1284302, C	1-20

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 05. 99

国際調査報告の発送日

18.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり



4N

9839

電話番号 03-3581-1101

内線 3488



P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 26 MAY 2000

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 SEN-002PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/01223	国際出願日 (日.月.年) 12.03.99	優先日 (日.月.年) 12.03.98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12M 1/00, C12N 5/06		
出願人 (氏名又は名称) 軽部 征夫		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 24.08.99	国際予備審査報告を作成した日 16.05.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 齋藤 真由美 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 9839



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)





## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性（N）

請求の範囲 1-20 有

請求の範囲 無

進歩性（IS）

請求の範囲 1-20 有

請求の範囲 無

産業上の利用可能性（IA）

請求の範囲 1-20 有

請求の範囲 無

## 2. 文献及び説明（PCT規則70.7）

請求の範囲 1-20 に記載された発明は国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、それらの文献の記載を組み合わせることにより当業者にとって容易に発明できたものでもない。



## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 9905	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/01207	International filing date (day/month/year) 12 March 1999 (12.03.99)	Priority date (day/month/year) 03 April 1998 (03.04.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C08F 290/06, C09J 175/16, G11B 33/12, C08G 18/67		
Applicant THREE BOND., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
- These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 September 1999 (16.09.99)	Date of completion of this report 09 June 2000 (09.06.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01207

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01207

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-4	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-4	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-4	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

The inventions relating to claims 1 through 4 are not described in any of the documents cited in the ISR, nor are they obvious; thus they appear to possess novelty and to involve an inventive step.





## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference SEN-002PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/01223	International filing date (day/month/year) 12 March 1999 (12.03.99)	Priority date (day/month/year) 12 March 1998 (12.03.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12M 1/00, C12N 5/06		
Applicant CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
	These annexes consist of a total of _____ sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items:
I	<input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II	<input type="checkbox"/> Priority
III	<input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	<input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V	<input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	<input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII	<input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII	<input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 24 August 1999 (24.08.99)	Date of completion of this report 16 May 2000 (16.05.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01223

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01223

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

The inventions described in claims 1 through 20 are not described in any of the documents cited in the ISR, nor in any of the documents considered relevant to the inventions; furthermore they would not be easy for a party skilled in the art to invent based on a combination of the descriptions in those documents.



⑩ 日本国 許 庁 (J P)

⑪ 特 許 出 願 公 開

⑫ 公 開 特 許 公 報 (A)

昭60-83583

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公 開 昭和60年(1985)5月11日

C 12 N 15/00

7115-4B

審査請求 未請求 発明の数 3 (全10頁)

⑮ 発明の名称 生細胞レーザー穿孔装置

⑯ 特 願 昭58-191378

⑰ 出 願 昭58(1983)10月13日

⑱ 発 明 者	粕 谷	敬 宏	和光市広沢2番1号	理化学研究所内
⑱ 発 明 者	塚 越	幹 郎	和光市広沢2番1号	理化学研究所内
⑱ 発 明 者	野 宮	芳 雄	和光市広沢2番1号	理化学研究所内
⑱ 発 明 者	井 川	洋 二	和光市広沢2番1号	理化学研究所内
⑱ 発 明 者	倉 田	俊 一	東京都府中市片町3-3-1	
⑲ 出 願 人	理 化 学 研 究 所		和光市広沢2番1号	
⑳ 代 理 人	弁 理 士 中 村 稔		外4名	

明 細 書

1. 発明の名称 生細胞レーザー穿孔装置

2. 特許請求の範囲

(1) レーザー光源、

このレーザー光源から発せられたレーザー光を生細胞へ投射する光学系、及び

前記の生細胞の状態を監視するモニターを備えることを特徴とする生細胞レーザー穿孔装置。

(2) 前記のモニターが、前記生細胞上に2次元的にレーザー光を走査する走査手段を含むことを特徴とする特許請求の範囲第(1)項記載の生細胞レーザー穿孔装置。

(3) レーザー光源、

このレーザー光源から発せられたレーザー光を生細胞へ投射する光学系、

前記の生細胞の状態を監視するモニター、  
このモニター上の生細胞の位置を決定する位置決定手段、

この位置決定手段からの始動信号にตอบสนองしてレーザー光源からのレーザー光の放出を制御す

るレーザー光制御手段、及び

前記の位置決定手段からの位置信号にตอบสนองしてレーザー光を指定位置に投射するよう前記のレーザー光の投射位置を制御する投射位置制御手段、

を備えることを特徴とする生細胞レーザー穿孔装置。

(4) レーザー光源、

このレーザー光源から発せられたレーザー光を生細胞へ投射する光学系、

前記の生細胞の状態を監視するモニター、  
このモニター上の生細胞の位置を決定する位置決定手段、

この位置決定手段からの位置信号にตอบสนองして指定位置を記憶する記憶装置、及びこの記憶装置からの位置情報を脱出してレーザー光を指定位置に投射するよう前記のレーザー光の投射位置を制御する投射位置制御手段、

を備えることを特徴とする生細胞レーザー穿孔装置。





3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は生細胞レーザー穿孔装置、更に詳細には動植物の生細胞にレーザー光を投射して、生細胞の細胞壁又は細胞膜に穿孔を開け、これを通してDNA等の物質を細胞又は細胞核に取り込ませる生細胞レーザー穿孔装置に関する。

(従来技術)

近年、動植物の生細胞に異種細胞の遺伝子移入技術が確立しつつある。生物の形質を決定する多くの遺伝子がどのような遺伝情報を有しているかを解明するためには、この遺伝子移入技術を用いて、細胞に特定の遺伝子を移入し、この移入された細胞の形質の変化を観察するのが、最も効果的な方法である。例えば、癌化した細胞Aのどの遺伝子が発癌の遺伝情報を担っているかを知るためには、癌化した細胞AからDNAを抽出し、これを断片化した正常細胞Bに移入し、その正常細胞Bが癌化すれば、移入した断片に発癌遺伝子が含まれていることが判る。即ち、遺伝子移入技術

は癌の原因と考えられる発癌遺伝子を検索するうえでも、極めて重要な手段となつてゐる。

ところで、遺伝子移入を行なう具体的な方法としては、リン酸カルシウムでDNAを沈殿させ食作用を通じて細胞内へ移入する方法と、特開昭58-76091号に開示されるように光学顕微鏡下で細い針を使い、細胞に小さな穴をあけてDNAを移入する方法とが用いられている。しかしながら前者の方法を使用すると、高い濃度のリン酸カルシウムで細胞を処理するので正常細胞の損傷を伴なりとともに、DNAを移入できる確率は高々一万分の一程度の低率であるという問題がある。また後者の方法では熟練と多大の労力を要し、やはり一定時間に多量の細胞にDNAを移入することには限度がある。多数の細胞にDNAを同一条件ですみやかに移入できることが望まれるが、発現効率の極めて小さな遺伝子も存在するので、短時間に多数の細胞を処理しうることが特に望まれる。

また、上記従来の遺伝子移入技術では、堅固な

細胞壁を有する植物細胞には、遺伝子を移入することができなかつた。

(発明の目的)

従つて、本発明の目的はDNA等の物質を短時間に極めて多数の生細胞に同一条件ですみやかに移入することのできる装置を提供することにある。

また、本発明の別の目的は各種の動植物の生細胞に特殊な処理を加えることなく、穿孔を開けることのできる装置を提供することにある。

(発明の構成)

上記目的を達成するために本発明者が鋭意研究を行なつたところ、生細胞にレーザー光を投射すると、その投射された細胞の表面状態が改変してDNA等の物質を取込める状態(以下、この状態を説明の便宜上仮に「穿孔」とし、かつこの状態を形成することを「穿孔を開ける」と言うことにする)になることを見出した。本発明はかかる知見に基づくものである。

即ち、本発明の第1のレーザー穿孔装置は、レーザー光源、このレーザー光源から発せられたレーザー光を

生細胞へ投射する光学系、及び

前記の生細胞の状態を監視するモニターを備えることを特徴とする。

また、本発明の第2のレーザー穿孔装置は、

レーザー光源、

このレーザー光源から発せられたレーザー光を生細胞へ投射する光学系、

前記の生細胞の状態を監視するモニター、

このモニター上の生細胞の位置を決定する位置決定手段、

この位置決定手段からの始動信号に反応してレーザー光源からのレーザー光の放出を制御するレーザー光制御手段、及び

前記の位置決定手段からの位置信号に反応してレーザー光を指定位置に投射するよう前記のレーザー光の投射位置を制御する投射位置制御手段、を備えることを特徴とする。

更に、本発明の第3のレーザー穿孔装置は、

レーザー光源、

このレーザー光源から発せられたレーザー光を



生細胞へ投射する光学系、

前記の生細胞の状態を監視するモニター、

このモニター上の生細胞の位置を決定する位置決定手段、

この位置決定手段からの位置信号に回答して指定位置を記憶する記憶装置、及びこの記憶装置からの位置情報を脱出してレーザー光を指定位置に投射するよう前記のレーザー光の投射位置を制御する投射位置制御手段

を備えることを特徴とする。

即ち、本発明の本質的な特徴はレーザー光を生細胞に投射することにより、先に定義された意味での「穿孔」を開けるようにしたことにある。

なお、本発明において生細胞の状態を監視するモニターとは、TVカメラ等のように、生細胞の映像をとらえられるものの外に、分光手段等の、生細胞の物性的な特性をとらえるものをも含むものとする。

(発明の効果)

本発明においては、本質的にレーザー光を用い

たことにより得られる種々の効果を得ることができる。即ち、レーザー光は偏向手段により容易にその投射位置を高速かつ精密に制御することができるのと同時に、瞬時にして穿孔を開けることができるので、一定時間内に極めて多数の生細胞に穿孔を開けることができる。さらに、レーザー光はいくつかの特異な性質を有しているため生細胞のオペレーションには極めて有利である。即ち、レーザー光は指向性が大変優れており、これを顕微鏡に導入すると、その限界分解能まで小さな焦点を結ばせることができるので、細胞の照射面積を広い範囲で調整することができる。こうして生細胞に修復可能で且つ物質の透過性の高い最適な大きさの「穿孔」を開けることができる。また、レーザー光の波長を細胞壁や生体膜の光学的特性(吸収率、吸収スペクトル特性)に最も適した波長に選ぶこともでき、一層効率よく「穿孔」を開けることが可能となる。さらに、レーザー光としてパルスレーザーを使用し、そのパルス幅を調整すれば体積の小さな細胞の温度を高めることなく、

即ち細胞を生かしたままで「穿孔」を開けることができる極めて容易である。また、レーザー光の使用は電気制御系又はTVモニターとの連携を容易にし、穿孔作業の迅速かつ精密な制御を可能とする。さらに、レーザー光はその強度を電氣的に広範囲に制御しうることや、細胞内への焦点の深さを自由に光学的に調整することもできる。

このように、本発明はレーザー光を用いたことにより、生細胞に修復可能な穿孔を極めて高い効率で開けることができる。

また、堅固な細胞壁を有する植物細胞に対しても細胞壁を取り除かなくても、遺伝子を移入することが本発明によると可能となる。

従つて、細胞内への遺伝子の移入に本発明を用いることにより、いろいろな有用物質の細胞内生産(例えばヒトの有用物質(インシュリン等)を生細胞内で合成)、家畜や農産物の品種改良のための遺伝子移入(交配しない異種間植物での遺伝子の置換;受精を経由しない増殖での優良遺伝子の導入)を実現することができる。

(実施例)

以下、本発明を添付図面を用いて説明する。

第1図は本発明のレーザー穿孔装置の一実施例を示す概略図である。

YAGレーザー等の穿孔用レーザー光源1から発せられた長波長1060nmの穿孔用レーザー光2はKOP等からなる倍周器3により紫外線領域の穿孔用レーザー光(波長335nm または265nm)に変換されたのち、シャッタードライバ4により制御されるシャッター5を通過して、ビーム整形器6によりレーザー光2のビームの形状が調整されたのち反射鏡7により顕微鏡をかねた集光装置8方向へ向けられる。他方、He-Neレーザー等の参照用レーザー光源9からは可視光波長領域の参照用レーザー光(例えば、波長633nm)10が発せられ、ビーム整形器11によりこの参照用レーザー光10のビームの形状が調整されたのち反射鏡12により集光装置8方向へ向けられ、穿孔用レーザー光2と重ね合わされて、集光装置8内へ導入される。集光装置8に導入された穿孔



用レーザー光2および照明用レーザー光10は光偏向手段13を通過したのち集光レンズ8'により集光されステージ14上に載置された試料ホルダー15内にDNA等の物質を含有する溶液とともに存在する生細胞に投射される。生細胞に穿孔用レーザー光2が照射されると、この生細胞の穿孔用レーザー光2が投射された部分には周囲のDNA等の物質を内部に取り込む状態に改変する。即ち、本明細書でいう「穿孔」が開けられることになる。試料ホルダー15の背面からはランプ16により照明が得られ、試料ホルダー15を通過した光が集光レンズ8'を逆に通過して集光装置2の上部に取り付けられたTVカメラ17により試料ホルダー15内に投入された生細胞の位置分布のイメージがとらえられ、これがモニターTV18上に可視像として再現される。試料ホルダー15を載置するステージ14は2次元的に駆動できるいわゆるX-Yステージである。このステージ14はステージ位置制御装置19から発生されたパルス数に応じて所定の角度だけ回転する

パルスモータ20により精密に駆動される。なおシャッター5はシャッタードライバ4によりその開閉が制御され、レーザー光2の通過を制御する。このように構成されたレーザー生細胞穿孔装置においては、生細胞への穿孔は例えば次のようにして行なわれる。試料ホルダー15中の生細胞の分布状態を、ステージ14を移動しつつモニターTV18により観察し、生細胞の分布している領域を選択し、次にシャッター5を開放してレーザー光2を試料ホルダー15に連続的に投射するとともに、ステージ14を移動すると、試料ホルダー15中の生細胞に穿孔が開けられる。このように生細胞に穿孔が開けられると、周囲の溶液中に存在するDNA等の物質が、この穿孔を通して生細胞内に取り込まれる。この後穿孔は数秒以内に修復され、特定の遺伝子情報を有する生細胞が形成される。本実施例においては装置が極めて簡易であるにもかかわらず、試料ホルダー15中の細胞の分布密度が高く、一種類のみの細胞しか存在しない場合は、有効な手段である。なお、光偏

向手段13はレーザー光2および10を2次元的に偏向するものであり、例えば第2図に示されるように、2つのガルバノミラーモータ13'、13''の組み合わせからなるものが使用される。この光偏向手段13を2次元走査制御手段38によりレーザー光10を2次元的に走査し、その時得られる反射光、発光、散乱光を集光装置8を介してTVカメラ17あるいはステレオカメラによりとらえられ、細胞の細胞にわたる映像をとらえることができることを本発明者は見出したが、このレーザー光10を走査することによつて得られた細胞(ヒトの赤血球)の顕微鏡写真を第3図に示す。第3図において、中央部の白線に囲まれた部分が可視光レーザー10を走査することにより得られたものであり、その他の部分、即ちランプ16により得られた通常の顕微鏡写真では得られない内部構造を観察することができる。このようにレーザー光を走査することにより得られる反射光、発光、散乱光をとらえれば試料のより詳細な映像を観察できることの理由は必ずしも明らかで

はないが、レーザー光を使用したことにより、極めて小さな焦点が集光レンズにより形成され、ある特定の焦点面のみからの画像情報が得られたものであると考えることができる。上述のレーザー光の走査による生細胞の状態の監視を本発明において併用すると生細胞に穿孔を開けた際の内部構造の変化等を観察することができるので極めて有効である。

第4図は本発明のレーザー穿孔装置の別の実施例を示す概略図である。

本実施例は細管20中を生細胞を通過させ、この際穿孔用レーザー光源21により生細胞に穿孔を開けるようにしたものである。即ち生細胞を含有した懸濁液22は、生理食塩水等の保護液23とともに細管20を通過するが、この際まずプローブ用レーザー光源24と検出器25によつて生細胞の通過が検出され、この検出の際に検出器25から発せられる検出信号がCPU(中央処理ユニット)26に入力される。しかる後このCPU26により制御されることにより所定のタイミン



で穿孔用レーザー光源21からレーザー光が送られて、集光レンズ31等からなる光学系を通過したのち生細胞にレーザー光が投射されて生細胞に穿孔が開けられる。懸濁液22あるいは保護液23内にDNA等の物質を含有せしめておけば、この物質が生細胞中に取り込まれるようになることは言うまでもない。本実施例によると毎秒1000個程度の生細胞に穿孔を開けることができるという極めて高速な処理が可能となる。なお、検出器25としてプロープ用レーザー光源24から、送せられたレーザー光を生細胞を投射した際に生じる散乱光の散乱角を検出しうるものによれば、生細胞の大きさを検出することができ、これによつて生細胞の種類を特定することができる。(生細胞の大きさと生細胞の種類とは段々一対一に対応することが知られている。)このようにすると、複数の種類の生細胞が懸濁液22中に含まれていても特定の生細胞のみに穿孔を開けることができる。また、穿孔用レーザー光源21からのレーザー光の放出の制御も、レーザー光源21

自体を制御するのではなく、レーザー光源21と細管20との間にシャッターを設けこれを制御するようにしてもよいことは言うまでもない。

第5図は本発明のレーザー穿孔装置の更に別の実施例を示す概略図である。

本実施例は生細胞を散滴とともに落下させ、この落下の際に生細胞にレーザー光により穿孔を開けるようにしたものである。

生細胞を含有した懸濁液22及び生理食塩水等の保護液23はそれぞれ空気ポンプ27、27'により加圧されることにより、ノズル28へ移送される。ノズル28へ移送された懸濁液22と保護液23からなる生細胞を含有した混合液は、圧電素子等からなる超音波ノズル振動子29により、下方へ散滴30となつて落下する。この間まプロープ用レーザー光源24と検出器25によつて散滴30中の生細胞の通過が検出され、この検出の際に検出器25から送られる検出信号がCPU26に入力され、しかる後にこのCPU26により制御されることにより所定のタイミングで穿孔

用レーザー光源21からレーザー光が送られて、集光レンズ31等からなる光学系を通過したのち、生細胞にレーザー光が投射され生細胞に穿孔が開けられる。

本実施例においては、生細胞が散滴となつて落下するので、散滴に予め電荷を与えておき、図示されるように、電極32、32'により散滴の落下通路に電界を形成し、この電界を制御するようにすれば、各散滴を分類して集めることができる。即ち、生細胞の種類あるいは穿孔が開けられたか開けられなかつたかによつて生細胞を液留33、33'等に分離して集めることができる。なお、DNA等の細胞に取り込まれる物質は懸濁液22、保護液23あるいは液留33、33'内に存在せしめておけば、穿孔が開けられた生細胞に取り込まれることになる。また、穿孔用レーザー光源21からのレーザー光の放出の制御も、レーザー光源21自体を制御するのではなく、レーザー光源21と散滴30との間にシャッターを設けこれを制御するようにしてもよいこと、およびレーザ

ー光の放出を全く制御することなく連続的に放出するようにしてもよいことは上述と同様である。

第6図は本発明のレーザー穿孔装置の更に別の実施例を示す概略図である。

本実施例においては、モニターTV18上の生細胞の位置を指示することによりこの指示された生細胞の位置を決定するライトペン34と、ライトペン34がモニターTV18上を指示することによりライトペン34の指示位置に対応するレーザースポットの位置を決定するスポット位置検出手段35が備えられており、この位置決定手段により決定された指定位置にレーザー光を投射するように、集光装置8内の光偏向手段13を制御するスポット位置制御装置36が設けられている。このスポット位置制御装置36は、位置決定手段により決定された座標位置を表わす位置信号が入力されると、レーザー光の投射が前記決定された位置で行なわれるように光偏向手段13を駆動する。このように構成された装置を使用して生細胞にDNA等が取り込まれるように穿孔を開けるた





めには、試料ホルダー15内の生細胞の分布をモニターTV18でモニターし、モニターTV18上に映し出された所望の生細胞の特定の位置をライトペン34で指示する。このライトペン34の指示が行なわれると、指示した位置がスポット位置算出手段35により算出される。この算出された位置は位置信号となつてスポット位置算出手段35から出力され、スポット位置制御装置36に入力される。スポット位置制御装置36は入力された位置信号に反応してレーザー光2、10がライトペン34により指定された指定位置に投射するよう光偏光手段13を制御駆動する。また、ライトペンの指示が行なわれると、この指示の始動を示す始動信号が位置決定手段からほぼ同時に発せられ、シャッタードライバ4に入力し、所定の期間だけ、シャッター5が開放される。従つて所定のパルス数のレーザー光2がライトペン34より指示された位置へ投射される。穿孔を開けられた生細胞が周囲のDNA等の物質を取り込んだ後、穿孔が修復して物質の移入が完了される

のは前述のとおりである。

本実施例においては、所望の生細胞の特定の位置に確実に穿孔を開けることができるという極めて優れた利点を得ることができる。

なお、本実施例においてはレーザー光の投射位置を制御するのに光偏光手段13をスポット位置制御装置36により制御駆動するようにしたが、ステージ14をステージ位置制御装置19により制御駆動するようにしてもよいことは言うまでもない。

第7図は本発明の穿孔装置の更に別の実施例を示す概略図である。

本実施例は、以下の様に装置が作動するように構成されている。即ち、ライトペン34により、はじめモニターTV18上に映し出された全てのあるいは複数の所望の生細胞の特定の位置を指示した後、これら指示したことによつてスポット位置算出手段35により算出された各位置は、デジタル化された位置信号とされ、CPU40を介してメモリー41に記憶される。一旦メモリー41

に記憶された位置信号は、一つづつ読み出されてCPU40等を介してスポット位置制御装置36に入力される。位置信号が入力されたスポット位置制御装置36は前記実施例と同様に光偏光手段13を制御駆動する。また、これとほぼ同時にCPU40からはシャッタードライバ4を駆動する駆動信号が発せられ、所定の期間だけシャッター5が開放され、レーザー光2の投射が行なわれる。従つて、予めライトペン34により指示された複数の指定位置にレーザー光2が順次投射される。このように構成されていると、モニター上の生細胞の位置を決定する作業を一括して行なうことができるので極めて効率よくかつ高速に多数の細胞に穿孔を開けることができる。なお、TVカメラ17から得られるビデオ信号の信号強度から生細胞が存在するかどうかを判断することができるので、この機能をスポット位置検出器35に含ませれば穿孔作業を完全に自動化することができる。即ち、TVカメラ17からのビデオ信号をスポット位置検出器35により解析し、これに

よつて生細胞の位置を順次決定し、この決定された位置の情報を有する位置信号をメモリー41に読出し、これを指定位置として記憶させることも可能である。この場合生細胞を認識する手段としてパターン認識手段を使用することが可能である。

上記説明においてはモニターとしてTVカメラを使用した場合について説明したが、第7図に示されるように分光器42、光子計数器43、多チャンネル分析器44からなる分析手段をモニターとして使用することができる。即ち、試料の特定のポジションにおける分光特性を観察することにより、前記ポジションに生細胞が位置するか、あるいはさらに核が位置するかを判定することができる。このような分析手段をモニターとして使用する場合においても上述のように同様のレーザー穿孔装置を構成することが可能となる。

上述のある実施例においては、穿孔用レーザー光源と参照用レーザー光源の2つのレーザー光源が使用されたが、穿孔用レーザー光として可視光領域で連続発光のものが使用される場合は、レ-



レーザー光のスポット位置がTVモニターにより確認することができるので照射用レーザー光源は必ずしも必要でない。また、穿孔用レーザー光の放出を制御するシャッターも機械的なものでなくてもよく、従来公知の光スイッチを使用することができる。さらに、本発明においては、パルスレーザーの代わりにCWレーザーを用いても、単位時間および単位面積当たりの照射エネルギーを調整することにより同様の効果を上げることができる。

最後に、本発明を用いて実際に細胞内に物質が取り込まれたことを示す実験結果を記述する。

まず、オスボーンメンデルラットの腎臓の細胞由来の腫瘍細胞NRKを大腸菌由来の遺伝子(Xanthine - guanine phosphoribosyl - transferase)を取込まないと生存できない状態に処理し、このように処理したNRKを前記の遺伝子を含む媒質(DMEMに10%牛胎児血清を加えたもの)に加えた。このようにして作成された試料を第1図に示されるレーザー穿孔装置の試料ホルダーに装填した。試料ホルダーの隔壁の一部は

穿孔用レーザー光2に対して充分な透過性をもつ材質でつくられ、この部分に細胞を固着(懸濁)させた。次いで、穿孔用レーザー光源であるYAGレーザーから発射される波長1060nmのレーザー光を倍増鏡により波長335nmの紫外線領域のレーザー光に変換し、集光装置に導入し、パルス幅10ナノ秒のレーザーパルス毎秒10パルスの繰り返し率で前記媒質中で隔壁に懸垂している生細胞に照射した。その結果を第8図に示す。第8図の左半部はレーザー光が照射された部分であり、右半部はレーザー光が照射されなかつた部分である。

レーザー光を照射された生細胞は遺伝子を取込み生存しているのに対し、レーザー光を照射されなかつた生細胞はすべて死滅した。

生細胞は穿孔された直後に修復してしまう。このためTVモニターでは穿孔状態を確認できても写真撮影は困難であるので生細胞ではないがヒトの血球を染色し、これにレーザー光を照射して穿孔した状態を第9図に示す。この図は生細胞に穿

孔した直後の状態と同じ様相を示し、本発明の装置により細胞の特定箇所を選択して穿孔することができることを示している。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図、第2図、第4図、第5図、第6図および第7図は本発明のレーザー穿孔装置の概略図、

第3図は、細胞上をレーザー光により走査した際に得られる細胞の顕微鏡写真、

第8図は本発明の装置により遺伝子を移入した生細胞の形貌を示す顕微鏡写真、

第9図は穿孔を開けた細胞(ヒトの血球)を示す顕微鏡写真である。

1, 21...穿孔用レーザー光源、2...穿孔用レーザー光、3...倍増鏡、4...シャッタードライバ、5...シャッター、6, 11...ビーム整形器、7, 12...反射鏡、8...集光装置、9...照射用レーザー光源、10...照射用レーザー光、13...光偏向手段、13', 13''...ガルバノメーターミラー、14...ステージ、15...試料ホルダー、16...ランプ、17...TVカメラ、18...モニターTV、

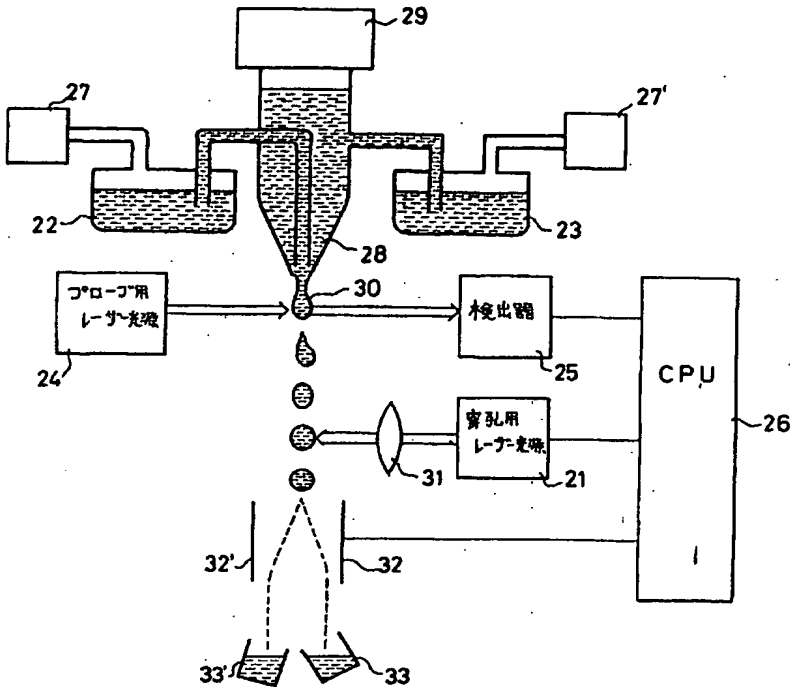
19...ステージ位置制御装置、20...細管、22...懸濁液、23...保護液、24...プロープ用レーザー光源、25...検出器、26...CPU、27, 27'...空気ポンプ、28...ノズル、29...超音波ノズル振動子、30...液滴、31...集光レンズ、32, 32'...電極、33, 33'...液滴、34...ライトペン、35...スポット位置算出手段、36...スポット位置制御装置、40...CPU、41...メモリー、42...分光器、43...光子計数器、44...多チャンネル分析器。



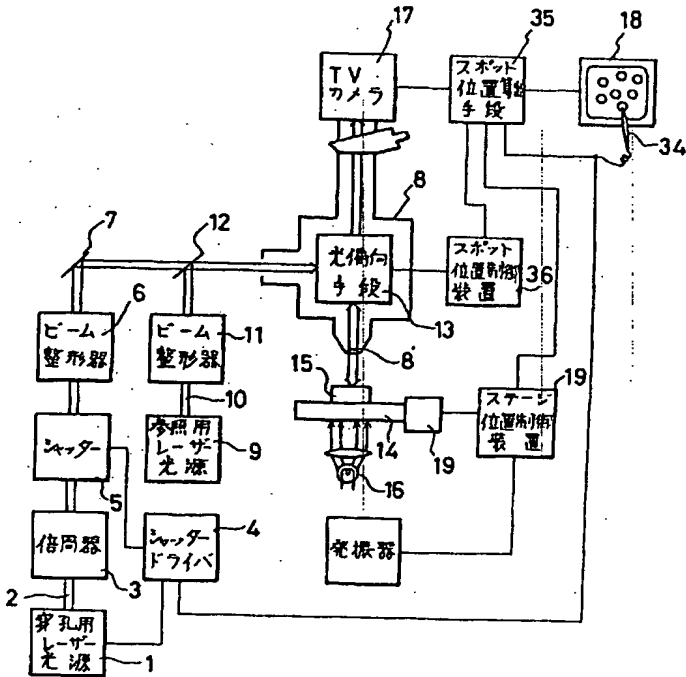




第 5 図



第 6 図













PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12M 1/00, C12N 5/06</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/46361</p> <p>(43) 国際公開日 1999年9月16日(16.09.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01223</p> <p>(22) 国際出願日 1999年3月12日(12.03.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/80177 1998年3月12日(12.03.98) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 輕部征夫(KARUBE, Isao)[JP/JP] 〒216-0002 神奈川県川崎市宮前区東有馬一丁目3番16号 Kanagawa, (JP) 齋藤 敬(SAITOH, Takashi)[JP/JP] 〒116-0013 東京都荒川区西日暮里一丁目42番2-1002号 ライオンズマンション西日暮里第2 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: TECHNIQUES FOR PIERCING SPECIFIC SITE OF CELL</p> <p>(54)発明の名称 細胞の特定部位穿孔技術</p> <p>(57) Abstract Techniques for regulating membrane denaturation reactions without resort to any physical shear force. Namely, a method which comprises reacting a stimulus (light, etc.) with a compound which is activated by this stimulus on a membrane such as a biomembrane to thereby induce membrane destruction at a specific site; and membrane structures (cells, etc.) with membrane destruction at a specific site obtained thereby. Use of these membrane structures makes it possible to transfer genes, etc. Materials for causing membrane destruction at a specific site. Use of these techniques makes it possible to easily pierce cell membranes with ultrafine members constituting, for example, microinjectors, micromanipulators or microelectrodes which are hardly usable in piercing cell membranes by the conventional techniques.</p>		

(57)要約

物理的剪断力以外の膜変性反応を制御する技術を開発した。例えば光等の刺激とその刺激により活性化される化合物とを生体膜等の膜上で反応させることにより、部位を限定して膜破壊を生じさせる方法を提供した。この方法を利用して取得される、部位を限定して膜破壊が生じた細胞等の膜構造体を提供した。また、この膜構造体を利用した遺伝子等の物質の導入が可能となった。さらに、部位を限定して膜破壊を生じさせるための膜破壊部材を提供した。例えば、マイクロインジェクション装置、マイクロマニピュレーター、微小電極等を構成する微小部材で従来細胞膜を貫通することが困難であったものでも、容易に貫通させることができるようになった。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TR	トルコ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NO	ノールウェー	YU	ユーゴスラビア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明細書

### 細胞の特定部位穿孔技術

#### 技術分野

本発明は、膜変性剤等を用いて細胞膜等の膜を部分的に処理することにより膜を穿孔する方法に関する。また、この方法を用いて作出した孔を持つ細胞等の膜構造体に関する。さらには膜変性効果を有する膜破壊部材に関する。

#### 背景技術

遺伝子治療や、生物を利用した人工的な物質生産系等において、細胞内に核酸や蛋白質等の物質を導入する手法はきわめて重要である。逆に、細胞内から核等の組織を取り出す技術も近年重要視されており、クローン動物の作出等に利用されている。言い換えれば、生物を構成する基本単位である細胞に対して物質を注入したり取り出したりすることは生物工学の基本技術であると言える。

しかしながら、このような物質導入や取り出しの技法として効率的なものは限られている。

従来の物質導入技法を大別すると、

- a) 不特定の細胞群を対象にした導入手法
- b) 特定の細胞を対象とした導入手法

の2者に分けられる。

a) の技法としては、ウイルスベクター（レトロウイルスベクター等）を用いた導入法、非ウイルスベクター（リポフェクチン等）を用いた導入法、電気穿孔法、りん酸カルシウム法、パーティクルガン法等を例示することができる。また b) の技法としては、マイクロインジェクション法を例示することが出来る。[「遺伝子治療の基礎技術」, 羊土社(1995)]

一般的に b) の技法は、卵細胞のような大型の細胞に対して用いられる場合が多い。この理由のひとつは、マイクロインジェクション法が微細ガラス管の剪断力を用いた細胞膜破壊を利用しているためで、細胞の大きさにより技術的限界が

生じてくるものと考えられる。また、本技法は施術者の熟練を要する技法でもあり、自動化は困難である。また卵細胞以外の一般の細胞には細胞膜の柔軟性故にピペットが刺入できない場合も多い。

a) の技法は、不特定の細胞群に対して確率的に処理を加え、細胞群の一部が目的となる物質導入が導入されることを期待するものである。したがって、すべての細胞内に目的物質が導入されることは希である。また、目的物質が導入された細胞のみを分離する作業は、一般に困難であることが多い。

また、細胞内の組織を無傷のまま取り出すためには、精巧なマイクロマニピュレータが必要であり、上記のマイクロインジェクション法と同様の問題が存在していた。

このように、細胞処理が医学・工学において日常的な技術となっている現在、細胞処理の再現性・精度の向上は非常に重要な課題である。例えば、生殖細胞の処理に際しては、卵細胞が体細胞に比較して各個体から非常に少数しか得られない貴重な遺伝資源であることを考慮すると、その処理の成功率が施術者の技量に左右されるという状況は工学的見地から大きな問題である。

また、上記の処理はいずれも、単細胞、遊走性細胞あるいはガン細胞のような生体からの単離・生体への再導入が可能な細胞に限られていた。したがって、神経細胞のように生体と不可分の細胞への改変処理は極めて困難なものであった。

上記に例示したもの以外にも、細胞の改変による技術発展の可能性はますます大きくなっている。以下に典型的な例を数例示す。

1) クローン生物の作成には卵細胞の膜を介して核または染色体遺伝子を注入する作業が必須であるが、成功率は非常に低い。

2) 特定の細胞に磁性体を組み込んだ細胞を作製することができれば、細胞の位置を磁氣的に制御することが可能となる。一般的には、磁性細菌由来の磁性体生成遺伝子を導入する手段が用いられており、成功例があるが、医療用途の細胞等においては人工的な磁性体を挿入した方が適する場合も多い。

3) マイクロマシン、例えば細胞レベルの微小手術機械を作製するためには、単なる物理的手段では細胞膜を切開するに足る切削出力が得られないことは容易に想像される。また、単なる化学反応による膜破壊では破壊制御の上で問題がある。

4)神経細胞の活動電位計測・電気刺激において、基礎研究用の電極を除く実用電極はいずれも細胞外での計測・刺激を行っていた。これは本来の神経活動に関わる電位閾値に比較して検出信号の微弱化／刺激入力が増大という、精度の向上を妨げる問題の原因となっていた。神経細胞内に電極を設置可能となれば、神経の本来の電位閾値に同等の計測・刺激が可能となることに加え、電極と神経の情報交換が一对一の精度で行うことが可能となる。

5)エネルギー変換工学分野において、人工光合成を目指し光起電力を持つ微小な光電変換素子の人工膜への配置の研究が行われている。これは光電変換素子による起電力を膜間電位発生に利用するものである。このような微小光電変換素子を細胞膜中／ミトコンドリア膜中に配置可能となれば、細胞代謝に必要なエネルギーを光で供給することが可能になる。すなわち、様々な細胞に植物のような光エネルギー利用能力を付加することが可能になるものと考えられる。

#### 発明の開示

これら細胞処理の根本的な問題点は細胞膜の破壊を制御する技術の不備にある。単に細胞を破壊する用途であれば、種々の毒物が長期にわたって検討されている。しかしながら、細胞死を引き起こすことなく、部分的かつ一時的に細胞膜を破壊するという細胞工学上の要求に応えるものではなかった。また、微細ガラス管等を用いる物理的な剪断力利用した方法には限界があった。すなわち、本発明が解決しようとする課題は物理的剪断力以外の方法で生体膜の破壊を制御しながら穿孔する技術、すなわち膜の破壊制御技術を開発することである。

膜破壊技術は前述の通り様々なものがあるが、部位特異的に破壊させる技術は限られていた。マイクロインジェクション装置やマイクロマニピュレーターは部位特異的な膜破壊を伴う装置であるが、膜破壊や穿孔は、物理的剪断力に依存していた。すなわち、本発明が解決しようとするもうひとつの課題は物理的剪断力以外の方法で生体膜の破壊を制御しながら穿孔するための部材を作出することである。

生体膜の破壊を制御しながら穿孔するために必要なのは、破壊場所と破壊量の制御である。そこで本発明者らは、膜を対象に、いかなる手法を用いれば膜破壊

の活性を制御しつつ膜の変性や穿孔が可能となるかに関して鋭意検討を加えた。

膜を一時的かつ部分的に変成／破壊する方法としては、リパーゼやプロテアーゼ等を用いる酵素的な破壊、ベータ線やレーザー光を用いる方法等も考えうるが、本発明者らは、物理的剪断以外の方法で細胞膜を破壊するための方法の一例として、リン脂質ラジカル連鎖過酸化反応に着目した。

一重項酸素やスーパーオキシドラジカルといった活性酸素は細胞膜の不飽和リン脂質を連鎖反応で過酸化する。それに対し細胞は膜中のラジカル捕獲剤である $\alpha$ -tocopherol (ビタミンE) や、水溶性の抗酸化剤である L-ascorbic acid (ビタミンC)、superoxide dismutase (SOD) 等の酸化防衛機構を持ち、酸化に抵抗する。["Free Radicals in Biology and Medicine", Oxford university Press (1985)]。

このような連鎖酸化作用が酸化防衛能を越えると、リン脂質膜破壊は指数関数的に急速に進行し、細胞膜がイオン透過阻止能を失うため、細胞は代謝維持が不可能となる。この連鎖膜破壊が進行すると最終的に細胞は死滅する。

光により活性酸素を生成し、このような脂質連鎖過酸化反応のトリガーとなる分子は光増感剤 (Photosensitizer, PS) と呼ばれる。一般的な光増感剤としては、ローズベンガル、ポルフィリン等が挙げられる。

このような光増感剤を膜変成剤として使用することで、膜の変成に際しては、目標となる最小限の細胞表面に部分的に短時間連鎖過酸化反応を起こすだけでよいことになり、しかも膜穿孔作業の際に過酸化反応により障害を受けた膜は、穿孔後に膜自身の流動性、また上記の抗酸化系により修復されることが期待される。

本発明者らは、神経系の培養細胞 PC12 の表面膜に光増感剤の一種であるターチオフェン (5',5''-bis(aminomethyl)-2,2':5',2''-terthiophene dihydrochloride) を塗布した。光増感剤は光照射により制御可能な膜変成剤である。膜抵抗の測定により、細胞全体へのレーザー光照射により活性化された光増感剤の作用で、膜抵抗、すなわち膜のイオン透過性が上昇することを解明した。また光量及び光増感剤の量を制御することで、光照射により引き起こされる膜抵抗変化は少なくとも

#### 1) 影響なし



## 2) 抵抗減少後回復

## 3) 抵抗消失

の3段階に制御可能であることを明らかにした。

さらに本発明者らは、特記すべき点として、膜のイオン透過性が破壊前の状態に回復する時間が好適条件下では30秒程度であることを見出した。

また、レーザー光により細胞の軸索部のみに光照射を行った場合も同様の膜抵抗変化が観測された。

さらに本発明者らは光増感剤を利用した細胞膜変成を、細胞への物質導入に応用可能であるか検討を行うため、マイクロインジェクション処理への適用を試みた。マイクロインジェクション処理に際しては水溶性蛍光染色試薬 Lucifer Yellow CH (LY) を含むインジェクション液を調整し、LY を PC12 細胞に注入可能であることをインジェクション成功の判定指標とした。また電動マニピュレーターによりインジェクション処理を自動化し、成功確率評価に及ぼす人為的な影響を極力排除した。

このようなインジェクション処理系において、インジェクション液中の光増感剤 ターチオフェン (5'5"-bis(aminomethyl)-2,2':5',2"-terthiophene dihydrochloride) 100  $\mu$ M の有無、および 100W 水銀ランプによる2分間の光照射処理の有無により、インジェクション成功確率がどのように変化するか測定を行った。

その結果、光増感剤含有インジェクション液を使用し光照射を実施した場合はインジェクション成功確率は約80%であった。その他対照例では同約0~10%であった。このように膜変性を利用することにより、顕著なインジェクション成功率の改善が認められた。

更にインジェクション処理後の細胞の LY 保持率を細胞生存率の指標として、光増感処理と通常処理の間での細胞生存率の比較を行った。光増感処理を行った細胞は3日~6日生存率が約90%と、通常処理による同生存率が10%程度であった場合に比較して有為に高かった。

これらの結果はすなわち、物理的剪断力によるインジェクション技術に対し、細胞に及ぼす傷害を抑える手段として、膜変性を利用することの技術上の優位を

明白に示すものである。

以上のことより、光増感剤と光との組み合わせを用いることによって、膜の好適な穿孔を実施しうることが示された。すなわち膜破壊の程度によって、細胞が死滅せずに膜が修復される条件を容易に見出しうるのである。当然、光増感材等の膜破壊材を支持体に塗布した膜破壊部材を作製し、この膜破壊部材と膜とを接触させることは容易に実施可能なことは言うまでもない。

例えば、膜変成剤を塗布したマイクロビーズを一例とする浮遊する膜破壊部材を利用し、レーザーピンセット等による操作によりこの膜破壊部材を細胞に接触させることも可能である。さらにはこのような接触状態において膜変成反応を開始させ、細胞内にこの膜破壊部材を入れることが可能である。膜変成剤自体がミセル等の膜構造体そのものであってもよい。

さらに本発明者らは、原子間力顕微鏡の走査プローブを電極化し、さらに光増感剤 5'5"-bis(aminomethyl)-2,2':5',2"-terthiophene dihydrochloride をその探針部に塗布した新しい部材を作製した。この光増感剤を塗布された部材が細胞膜内に挿入された場合には、膜内外の電極の間に細胞膜に起因する抵抗が観測される。原子間力顕微鏡の電極そのものが有する物理的剪断力のみでは細胞穿孔に足るだけの強度を有していないことから、新たに作製されたこの部材は、原子間力顕微鏡の電極機能と制御的膜破壊機能の両者を兼ね備えた部材として利用しうることを示した。既存の数多くの部材に光増感化合物等の塗布または固定を行うことにより、従来の機能に加えて制御的膜破壊機能を付与することも容易に行い得る。

すなわち、本発明は以下のものを含む。

(1) 特定の刺激により膜変性反応が誘起される特定の化合物を含む薬剤を膜の一部または全部に接触させた後、該刺激を与えることにより該膜の特定の部位を変性または穿孔する方法。

(2) 膜が細胞膜、細胞壁、生体膜または人工膜であることを特徴とする(1)に記載の方法。

(3) 刺激を与える領域が薬剤を接触させる領域に含まれることを特徴とする

(1)または(2)のいずれかに記載の方法。

(4) 薬剤を接触させる領域が刺激を与える領域に含まれることを特徴とする  
(1) または (2) のいずれかに記載の方法。

(5) 薬剤が支持体を用いて接触せしめられることを特徴とする (4) に記載の方法。

(6) 特定の刺激が光であり、化合物が光増感化合物であることを特徴とする (1) ~ (5) のいずれかに記載の方法。

(7) (1) ~ (6) のいずれかの方法を用いて得られる、特定の部位が変性または穿孔された膜または該膜を含む膜構造体。

(8) 膜が細胞膜、生体膜または人工膜であることを特徴とする (7) に記載の膜または該膜を含む膜構造体。

(9) 膜構造体が細胞、ミセルまたはリポソームであることを特徴とする (7) または (8) のいずれかに記載の膜構造体。

(10) 注入を目的とする化合物を含む薬剤とキャリアーとからなる複合体と、  
(7) ~ (9) のいずれかに記載の構造体とを混合することにより構造体内部に該化合物を注入する方法。

(11) キャリアーが液体または固体であることを特徴とする (10) に記載の方法。

(12) 物質が核酸または蛋白質であることを特徴とする (10) または (11) のいずれかに記載の方法。

(13) 支持体と、この支持体の表面の少なくとも一部に形成した、物理的剪断力以外の膜変性力を有する膜変性反応促進部位とを含む、膜の特定の部位を変性または穿孔することを目的とする膜破壊部材。

(14) 支持体が棒状、管状、針状、または球状であることを特徴とする (13) に記載の膜破壊部材。

(15) 膜変性反応促進部位に膜変性反応を生じせしめる化合物が塗布または固定されていることを特徴とする (13) または (14) のいずれかに記載の膜破壊部材。

(16) 膜変性反応が活性酸素種の直接・間接的な生成反応により開始される膜成分の連鎖的な過酸化反応を利用するものであることを特徴とする、(15) に記

載の膜破壊部材。

(17) 膜変性反応が、特定の刺激および反応前駆物質により誘起され膜の変性または破壊を生じせしめる反応を含む反応であることを特徴とする(15)または(16)のいずれかに記載の膜破壊部材。

(18) 特定の刺激が光で、反応前駆物質が光増感化合物であることを特徴とする(17)に記載の膜破壊部材。

(19) 膜の変性または破壊後、支持体が該膜を貫通し、貫通した該膜が該支持体と密着して接触することを特徴とする(13)～(18)のいずれかに記載の膜破壊部材。

(20) 膜が細胞膜、生体膜または人工膜であることを特徴とする(13)～(19)のいずれかに記載の膜破壊部材。

膜を変性または穿孔するために用いられる化合物と刺激との組み合わせとしては、膜が完全に破壊されるのではなく、制御可能な状態で穿孔することが可能なものであれば、いかなる組み合わせを用いても構わない。用いる刺激としては光を含む電磁波、放射線を含む粒子線、加熱、冷却、電気、磁気、超音波を含む振動、物理接触、化学物質の他、細胞を含む生物全般、ウイルス等を例示することができる。またこれらの刺激は単一の刺激として用いても構わないし、併用しても構わない。

膜を変性または穿孔するために用いられる化合物としては、膜変性や膜破壊に関与する酵素、抗体分子、膜結合蛋白質、糖脂質、脂質等を用いることも可能であるし、光増感剤であるポルフィリン、ローズベンガル、メチレンブルー、アシッドレッド、 $\alpha$ ターチエニル等及びそれらの誘導体を用いることもできる。また、活性酸素種等の酸化剤、還元剤、ニトログリセリン・ピクリン酸等爆発性化合物、磁性微粒子・磁性流体、金属粒子・半導体粒子・絶縁体粒子・光電変換素子・圧電素子等も適宜用い得る。またこれらの化合物は単独に用いられても構わないし、併用して用いられても構わない。

変性や穿孔を目的とする膜は、光電変換素子や圧電素子を含む膜であってもよいし、動植物の細胞膜や細胞壁、生体膜、あるいは人工膜であっても構わない。生体膜としては、細胞壁を含む細胞外皮、細胞膜を含む細胞内膜、核膜、ウイル

ス膜、細胞質微小管、ミクロゾーム膜、ゴルジ装置膜、リソゾーム膜、膜胞体膜、液胞膜、ペルオキシゾーム膜、プラズチド膜、リボソーム膜、ミトコンドリア膜等を例示することができ、またこれらを組み合わせて再構成した膜であってもよい。人工膜としては、タンパク質膜、脂質膜、コラーゲン等高分子膜、金属膜、半導体膜、絶縁体膜、ポリアセチレン・ポリチオフェン等導電性高分子膜等を例示することができる。

膜破壊の方法としては、第一に、細胞膜に化合物を接触させ、接触領域の一部を刺激処理することにより化合物が膜に接触した領域より小さい範囲のみに変性／破壊を生じさせる方法を提供しうる。例えば、水溶性の光増感化合物溶液で処理した細胞に対し、微細スリットを通した光を照射することにより、照射を受けた部分の細胞膜のみを破壊、穿孔することが可能である。

第二に、細胞膜の一部に化合物を接触させ、それよりも大きい領域を刺激処理することにより、化合物が接触した領域のみに変性／破壊を生じさせる方法を提供する。例えば、シリコン結晶を細工することにより得られた微小な支持体の一部に光増感化合物を塗布しておき、顕微鏡下で、この光増感化合物を塗布した支持体の領域を細胞表面に接触させた後に光刺激を与えることにより、支持体が接触した領域のみが膜破壊を起こす。

膜破壊部材を構成要素となる支持体としては例えば、結晶体、 $C_{60}$ 等マクロ化合物、マイクロピペット、ガラス微小電極、パッチ電極、金属微小電極、ワイヤー、ひげ結晶、細胞を含む生物、磁性微粒子・磁性流体、金属粒子・半導体粒子・絶縁体粒子・光電変換素子・圧電素子、マイクロマシン等の微小構造物並びにそれらを複合化した物体を挙げることができる。

特定の刺激として光は好適に用いられ、これに対応する化合物として光増感化合物が好適である。一般的に色素は光増感化合物として用い得る。色素のうち、ボルフィリン、ローズベンガル、メチレンブルー、アシッドレッド、 $\alpha$ ターチエニル等及びその誘導体も好適に用い得る。

上記に例示した方法を適宜用いることにより、その一部が変性を受けたり穿孔されたりした膜を提供することができる。また、このような膜変性や穿孔を受けた膜を含む膜構造体として水晶振動子や電極基板上に固定化され、膜変性／穿孔

によって膜の共振周波数・流動性・吸着性等物理的性質を変更可能な膜、あるいは気体／液体に接触し物質の透過性・透過部位を制御可能な膜等も挙げられるし、動植物の細胞膜や細胞壁、生体膜、あるいは人工膜等が膜変性／穿孔された膜であっても構わない。生体膜としては、細胞壁を含む細胞外皮、細胞膜を含む細胞内膜、核膜、ウイルス膜、細胞質微小管、ミクロゾーム膜、ゴルジ装置膜、リソゾーム膜、膜胞体膜、液胞膜、ペルオキシゾーム膜、プラズチド膜、リボソーム膜、ミトコンドリア膜等を例示することができ、またこれらを組み合わせて再構成した膜であってもよい。人工膜としては、磁性体を高密度で含む膜、タンパク質膜、脂質膜、コラーゲン等高分子膜、金属膜、半導体膜、絶縁体膜、ポリアセチレン・ポリチオフェン等導電性高分子膜等を例示することができる。

膜に変性や穿孔を受けた膜を含む構造体として、特定の数の穴が開いた細胞やミセルを例示することができる。細胞としては、動物、植物、微生物、生殖細胞、体細胞等が例示される。

注入を目的とする化合物は、通常の拡散では膜透過が困難な物質、人工的に膜透過を多量に行なう目的の物質等が挙げられ、具体的には核酸、蛋白質、脂質、膜構造体等を例示できる。

キャリアーとは、注入を目的とする物質を溶解したり懸濁したりすることが可能な気体、液体または固体のことで、例えば核酸を溶解した緩衝液等が例示できる。

膜破壊部材の形状は、膜の制御的破壊が可能なものであれば、目的に応じていかなる形状のものを用いても構わない。また、膜破壊部材は支持体と膜変性促進部位とを含むが、この膜変性促進部位は目的に応じて支持体の表面全体であっても構わないし、表面の一部であっても構わない。剣山状、球状、針状、棒状、管状等の形状、またはこれらの組み合わせ等、が提供可能である。例えば管状支持体としては、具体的にはピペット、チューブ、注射針等が例示しうる。球状支持体は、レーザーピンセット法により操作可能なビーズであっても構わない。

膜破壊部材を構成する支持体に膜変性反応を生じせしめる化合物を塗布したり固定したりする場合の塗布または固定の方法としては、溶媒蒸発乾燥、スパッタリング、真空蒸着、プラズマ重合、化学吸着、物理吸着、ラジカル重合、イオン

重合等を例示することができる。むしろ、支持体と化合物が中間物を介して間接的に結合していても構わない。

膜変性反応が活性酸素種の直接・間接的な生成反応により開始される膜成分の連鎖的な過酸化反応を利用するものである場合、生成反応の開始は光エネルギー供給、電気的エネルギー供給、化学的エネルギー供給等を用いて好適に実施する。詳しくは、光とは、波長 180 nm 程度の深紫外領域から遠赤外領域の電磁波である。なおレーザー発振による光を用いても構わない。この場合の光増感化合物としても、上述の光増感化合物が好適である。

膜破壊部材を用いて膜変性または膜破壊を生じせしめた場合、貫通部の膜と膜破壊部材またはこれを構成する支持体とが密着して接触していると好適であることもある。すなわち、マイクロインジェクションやマイクロマニピュレーション等の操作が可能な、ポンプと接続されている管状構造を有する膜破壊部材の場合、細胞内外の物質輸送の際には貫通部の膜と膜破壊部材またはこれを構成する支持体とが密着して接触していると好適なのである。

位置制御装置により制御可能な膜破壊部材も細胞処理等の作業には好適に用いられる。位置制御装置としては、原子間力顕微鏡等の走査プローブ顕微鏡、レーザーピンセット、マイクロマニピュレーター等を例示することができる。具体的には、膜破壊部材を構成する支持体として原子間力顕微鏡走査プローブ、近接光走査顕微鏡走査プローブ等を使用することが可能である。

本発明は、さらに当業者が適宜簡明な応用を施すことにより、様々な分野における技術として利用されうる。以下にその一例を紹介する。

まず、膜体操作としては、細胞・ウイルスといった膜を持つ物体の操作の機能を有する操作体と、対象となる膜体との結合・接触能力を持つ結合体を膜変成／破壊剤に連結・あるいは併用することで、目的となる膜体に膜破壊／変成とそのほかの操作を行うことが可能である。操作体と結合体と膜変性／破壊剤の三者は、三者単独、あるいは一体が二者を兼ねることも可能である。この場合の対象になる膜はリボソーム・細胞膜・細胞内器官膜・ウイルス膜等であり、結合体はポリクローナル抗体・モノクローナル抗体・金属ビーズ・プラスチックビーズ・ウイルス・細胞・生物等が挙げられる。使用環境としては大気中、液中、生体中等を

利用しうる。細胞・ウイルス操作としては変形・破壊・成長促進／抑制・形質転換・細胞死誘発・分裂／融合促進・凝集／解離促進・物質取込／排出促進等を例示できる。

細胞膜の一時的な穿孔による物質導入・取出技術としての応用も可能である。例えば、クローン生物の作成や遺伝子治療において、細胞への遺伝子注入は重要な作業である。

細胞融合に本発明を適用することも可能である。細胞融合処理にあたっては、ポリエチレングリコール等の化学物質やセンダイウイルス等のウイルスが利用されてきた本発明の膜変性反応を利用することにより、細胞融合を行うことも可能である。

さらには、細胞内に挿入した電極による細胞膜電位を利用した電池を作製することも可能である。マイクロマシンや体内医療機器において、動作動力源の確保は大きな問題である。膜破壊部材と電極とを用いて、細胞膜内外の電位を電力として使用することも可能となり、適宜細胞を電池とするシステムを構築可能である。細胞メスといった細胞レベルの超微小手術用ツールの作製に応用することもできる。手術手段として、各種メス等の様々な生体切開機器があるが、これらの機器は最小のものであっても組織を切開することまでしかできない。細胞以下のレベルの切開機器はこれまで存在しなかったが、本発明による膜破壊技術は細胞膜や核膜など細胞内の膜の切開に適用することが可能である。

また、遺伝子治療で用い得るドラッグデリバリーシステム（DDS）用薬剤含有ミセル・リボソームの部位特異的な破壊技術として、本発明を提供することができる。すなわち、薬剤の副作用を抑制しつつ、目的となる患部周辺で集中的に使用するためのDDS研究が進められているが、薬剤を入れたマイクロカプセルの破壊を、本発明の膜変成・破壊技術を適用することにより、効率的なDDSが可能である。

細胞内器官の操作にも本発明は適用されうる。すなわち、上記のマイクロマニピュレーターやマイクロインジェクション装置を用いることにより、細胞内のリボソームや核など、細胞内器官を操作が容易となり、ひいては効率のよい細胞処理が可能となる。詳しくは、生殖工学における卵細胞等操作（クローン作成等）



を例示することができる。

さらに本発明は、平面・球面等の膜を対象にした機能性分子の配列作業と新規機能発現に利用することも可能である。生体膜においては、様々な機能を持った膜タンパクが膜中で流動しつつ単独で、あるいは適宜離合集散することによって膜面内及び膜内外の化学物質の代謝・電子の伝達等、多様な機能を発揮している。このような膜面内や膜外の移動機能単位の組み合わせによる機能発現はまさに微小化学プラントと呼べるものである。このような反応場としての生体膜の機能発現をモデルに、膜破壊／変成技術により、人工膜や生体膜への各機能単位の取込を制御することで生体機能分子や、圧電素子や光電変換素子や記憶素子等といった人工物も膜デバイスとして組み込み可能になれば、非常に自由度の高い反応システムを構築することが可能になる。

さらには、膜操作とデバイス追加による細胞機能拡張を行うこともできる。すなわち、本発明の膜穿孔技術を用いて細胞と人工的な機能体との融合によって既存の細胞に対して新たな機能を付与することが可能となる。例えば、磁性細菌由来の微小磁性体粒子を入れた白血球を作り、磁氣的に白血球を患部に誘導すること挙げることができる。これはドラッグデリバリーではなく、セルデリバリーシステムと呼ぶことも可能な新しい技術である。

また、膜に光電変換素子を組み込むことで、細胞に光エネルギーを化学エネルギーに変換する植物細胞に特有な機能を持たせることも可能である。

さらに、神経細胞の信号入力・出力に、細胞膜に埋め込んだ光電変換素子を適用することにより、光情報処理型のコンピューターと直結して神経細胞を接続することも可能である。

また、マイクロマシンの医療用途への関心は大きい。このような医療用マイクロマシンは血管に入るほど小型である必要があり、動力源は制約を受けることになる。すなわち有線でのエネルギー供給は困難であり、一方マイクロマシンに搭載可能なエネルギーは微々たるものである。このためマイクロマシンによって細胞破壊や細胞改変等、細胞に影響を及ぼすには内蔵エネルギー源による物理的な手段では圧倒的に出力が不足することは明白である。膜破壊剤とその活性化はそのようなマイクロマシンによる細胞操作に必須の手段であるといえる。一例とし

て、膜破壊としてポルフィリン等の赤外線で活性化するような光増感剤を使用することにより、膜破壊に必要なエネルギーを体外から赤外線レーザー等により供給することが可能となる。

本発明はさらに、個々の神経に電極を接続し、電子情報機器と神経間で情報の授受を行う神経インターフェースの作成に対しても応用することができる。神経情報は一般的に細胞膜電位の変化、すなわち活動電位によって伝達される。この活動電位の発生、計測のための神経インターフェースと総称される、神経情報の入出力を行う神経—電子機器インターフェースが様々に検討されているが、電極と細胞の距離、及び集積度が問題となっている。基礎研究用途のガラス微小電極については細胞膜に刺入、あるいは吸着することで細胞膜電位を直接計測／操作可能であるものの、この電極は直径数ミリメートルのガラス管を加熱加工して作成するために、高密度集積は不可能であった。一方、半導体加工技術で集積化が容易な金属微小電極については細胞膜貫通能力に問題があり、非効率で部位特異性に問題のある細胞外での刺激・計測が行われてきた。本発明による膜穿孔技術と微小金属電極技術を組み合わせることで、細胞膜を穿孔し、細胞内に微小金属電極を設置する事が可能である。これはすなわち細胞と電極を一对一、あるいは細胞一つに電極を複数接続可能な理想的な神経インターフェースとなる。

本発明はまた、脳の基礎研究用途等、生体細胞機構解明に応用することが可能である。すなわち、脳機能解析には神経細胞の相互情報交流についての解析が必須であるが、現在、膜電位感受性色素を神経に負荷して、膜電位変化を吸光・蛍光変化として光学的計測によって神経活動を同時多点計測することが行われている。しかしながらこの場合、光学的に神経への入力を行うことは不可能であり、神経への入力と出力を充たすのは電気的な手段、すなわち電極に頼らざるを得ない。また、基板電極上に神経細胞を培養し、人工的にネットワークを形成させて神経の情報処理機構の解析、さらには神経細胞そのものを演算素子として応用する研究が行われている。この場合でも神経への信号入力がネックとなっている。基板上の電極は細胞外電極であり、神経細胞に活動電位発生閾値に達する刺激を与えるためには基盤上の神経集団を刺激し、個々の神経の受けた刺激の総和としてようやく活動電位を発生させうるという状態であった。個々の神経との情報交

換を行う電極の集合化の鍵となるのは、電極の細胞レベルまでの小型化並びに個々の細胞に電極を接続する手段であり、半導体プロセス技術で小型化した微小金属電極と膜穿孔技術の併用による細胞内電極挿入は、この目的を充たすものである。

本発明はさらに、機能的電気刺激用等、侵襲計測型医療用電極の高集積・高精度化に利用することが可能である。リハビリテーション医学の一環として、神経・筋肉の機能回復のために金属電極を神経束に挿入し電気刺激を行う、機能的電気刺激と呼ばれる手法が用いられている。現在、電極は神経束内に数カ所配置されるに留まっており、神経刺激の部位特異性／精度の面では不十分である。膜穿孔技術と既存の電極集積化技術の複合化により神経と電極の一对一接合を行うことが可能であり、それにより、機能回復が必要な神経に対してのみ電気刺激を行うことが可能となる。

また本発明は、種々の人工臓器に神経からの信号を伝達する技術として応用することが可能である。体内に埋込まれた器官の制御手段は、生体の直接的な神経情報によらず、あくまでも間接的な制御に留まっている。一例としては人工尿道弁の制御が挙げられる。形状記憶合金により作成されたこの弁は、加熱により開き、通常体温では閉じる。問題なのは体外の加熱装置のスイッチにより弁の開閉が行われることにあり、本人の意志によって直接弁の開閉が制御されるわけではない。膜貫通電極を用いた神経インターフェースによって神経情報の安定・高精度な計測が可能になれば、このような弁をあたかも使用者本人の体の一部であるように制御可能になる。確かに尿道弁は、使用頻度は一日数回程度で操作も開閉という簡単な器官であり、体外のスイッチ操作による生活上の不便はさほどではないと思われる。しかし、より高度な内臓機能の代行を行うような人工器官を制御するには、自律神経等を制御信号源とすることが不可欠である。

本発明はさらに人体同様に制御可能な間接や感覚器官を備えた義手・義足等の接続・制御にも用い得る。現在、交通事故等による四肢切断後の機能補助のための動力義手・動力義足等の機器の性能向上が著しい。しかしながらその制御情報源は装着者の残存している筋電を利用するものがほとんどであり、本来の四肢の制御に要する情報量に比較すると圧倒的に少ない。また、義手・義足からの装着

者側への感覚の伝達に至っては、義手装着部を介した物理的接触情報程度に限られている。そのため訓練によってそのような義手・義足の操作を習得しても、実際には大きな不便を強いられつつ使用するというのが現状である。この装着者と人工肢との間の情報授受経路が貧弱であることが、人工肢の性能向上を妨げる原因の一つとなっている。膜貫通電極を用いた神経インターフェースによって個々の神経情報の安定・高精度な計測が可能になれば、装着者の切断肢につながっていた神経にインターフェースを接合することでこれを人工肢の制御情報源、感覚信号入力端子として使用できる。すなわち、本来の体と変わらない運動性能・感覚器官を備えた人工肢を制御することが可能になる。

さらに本発明は、人工感覚器官（視覚・聴覚等）と生体との接続・制御に利用しう。すでに、聴覚機能再建のために人工内耳がある。これは鼓膜－内耳の機能をマイクロホンと信号変換回路によって代行するもので、蝸牛器官に数十個の電極を設置して、聴覚神経を電気刺激し聴覚情報を脳に送信する。この機器が医療機器として成立した最大の理由は、聴覚神経が周波数帯に応じて整列している蝸牛器官にある。この器官は特例的に電極から神経に非常に情報を送りやすく、この人工内耳の電極技術を他の器官には適用不可能である。感覚器官の中でも、生体の情報源として特に重要な視覚の機能再建に必要な、直径1 cmあたり100万本の神経軸索を含む視神経に接続するに足る電極系は一つの技術上の目標である。現在そのような高密度で集積可能な神経用電極は存在しないが、膜貫通電極を用いた神経インターフェースは視神経に対応した高密度集積化も可能である。既に光学機器は電荷結合素子（CCD）を用いた製品が安価に100万画素を実現しているため、このような光学情報入力機器を機能性義眼として用い、神経インターフェースを介して人体の側に視覚を提供することも可能である。

本発明は、さらに脳機能拡張にも応用しう。情報処理装置としての脳は半導体マイクロプロセッサと比較して、省エネルギー、並列処理、等の利点を持つ反面、情報保持の不正確さ、学習の困難等の弱点を併せ持つ。脳の利点を生かしつつ、このような弱点を補強するために、神経インターフェースを介して既存の半導体デバイスを脳と連動併用することも可能である。

### 図面の簡単な説明

図1は、5'5"-bis(aminomethyl)-2,2':5',2"-terthiophene (BAT)二塩酸塩の構造式を表す図である。

図2は、膜穿孔技術フローチャートを示す図である。

図3は、支持体が筒状の膜破壊部材と、これにより処理を受ける膜構造体との関係の一例を示す図である。

図4は、支持体が球状またはビーズ状の膜破壊部材と、これにより処理を受ける膜構造体との関係の一例を示す図である。

図5は、支持体が棒状の膜破壊部材と、これにより処理を受ける膜構造体との関係の一例を示す図である。

図6は、支持体が膜変成反応促進剤を含む液体を保持する筒状の膜破壊部材と、これにより処理を受ける膜構造体との関係の一例を示す図である。

図7は、支持体が原子間力顕微鏡プローブ状の膜破壊部材と、これにより処理を受ける膜構造体との関係の一例を示す図である。

図8は、パッチ電極を用いて細胞内電位及び膜抵抗を測定するための装置を模式的に表した図である。

図9は、光刺激の強さと細胞の膜電位変化または膜抵抗の変化との関係を表した図である。

図10は、光増感インジェクションの実施例のフローチャートを示す図である。

図11は、光増感インジェクションの実施例を模式的に表した図である。

図12は、通常の物理的インジェクション処理と、新規な光増感インジェクション処理におけるインジェクション成功率を比較した図である。

図13は、通常の物理的インジェクション処理と、新規な光増感インジェクション処理を施された細胞のインジェクション処理後の細胞生存率の変化を比較した図である。

### 発明を実施するための最良の形態

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

### 【実施例 1】 神経系株化細胞 P C 1 2 の培養

神経系株化細胞 P C 1 2 細胞は、中枢神経のモデルとして用いられるラット副腎髄質由来の神経節類似細胞である。熱非働化した馬血清 10%、牛胎児血清 5%、L-グルタミン酸 7.35 mg/l、L-グルタミン 2 mM を含む NeuroBasal Medium(GIBCO BRL 社製) (pH 7.3) を用いて P C 1 2 細胞を 95% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

継代培養は、培地を細胞に吹き付け培養フラスコ壁面よりはがし、300g、5 分の遠心分離により細胞を集めた後、底面積 25 cm<sup>2</sup> の培養フラスコ (IWAKI Glass 社製) 内に 1 ml あたり  $1\sim3\times10^4$  cells/cm<sup>2</sup> となるように細胞をまき、2~3 日毎に培地交換することにより行った。

PC12 細胞を神経様細胞に分化させる際にはマウス神経成長因子(Nerve Growth Factor, NGF)2.5S を最終濃度 50 ng/ml となるように培地に添加した。培地添加用 NGF (Murine, 2.5S) 分散液調製法は以下の通りである。

- 1) リン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline, PBS ; 組成は、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.10 g/l、NaCl 90.00 g/l、NaHPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 7.26 g/l、1 N NaOH 液で pH 7.4 に調整した。)
- 2) 牛血清アルブミン(Bovine Serum Albumin, BSA) 2 mg を 上記 PBS 1000  $\mu$ l (pH 7.4 に調整済) に分散し、分散液を ポアサイズ 0.22  $\mu$ m のフィルタを通し滅菌した。
- 3) この滅菌液 100  $\mu$ l と NGF solution 100  $\mu$ g/ml (GIBCO BRL 社市販品) を加え全量を 200  $\mu$ l に調整し、これを 8  $\mu$ l づつミニチューブに入れ、-20℃で凍結保存した。

このように分注した NGF 液を培地に 1000 倍希釈となるように添加することにより、PC12 細胞を分化させた。

PC12 細胞はプラスチックボトルの壁面に弱く接着し、小さいクラスターを形成しながら生育した。神経化した細胞の培養にはコラーゲンコートディッシュ (IWAKI Glass 社製) を使用した。

以下の電気生理実験には神経様細胞に分化開始後六日以上経過した細胞を使用した。

### 【実施例 2】 ビスアミノメチルターチオフェンの合成

使用した光増感剤は  $\alpha$  ターチエニル誘導体、5'5"-bis(aminomethyl)-

2,2':5',2''-terthiophene (BAT)である。本化合物は六車により論文[J. Heterocyclic Chem., 33, 1-6 (1996)]に従って合成され、BAT 二塩酸塩の状態 で提供された。BAT 二塩酸塩の構造式を図1に示した。

アミノメチル基を末端に持つチオフエンオリゴマーは末端アミノメチル基ゆえ に同種の他の誘導体と比較して水溶性が高い。このアミノメチル基の解離状態に よって水溶性は変化する。一方、本 BAT の場合は、酸性水溶液中では二価の正電 荷を持ち容易に溶解するが、生体に適した pH 領域 (7.4 付近) の水溶液中では、一 価の正電荷を持ち水溶性の高さを維持しているもの及び、無電価になりコロイド 状に凝集しやすいものが共存する性質を持つ。この pH 条件下において BAT 分散 液で細胞を灌流することで、この分子を細胞表面に容易に付加させることが可能 となった。BAT 分子の親水性は、 $\alpha$ -ターチエニル誘導体をはじめとする他の修飾 チオフエンオリゴマーに限らず、導電性高分子モノマーとして設計された他の分 子には類のない新規な性質である。

### 【実施例3】 光照射後の膜抵抗と膜電位の測定

細胞レベルでの微小な膜障害を、回復過程も含めて秒から数分のオーダーでモ ニタリングする必要があるため、電気生理実験の手法であるパッチクランプ法に より細胞膜間電位、あるいは細胞膜を透過するイオン電流を測定した。

光増感剤 BAT は HEPES (25mM, pH7.4) 緩衝液に分散した。マイクロピペットに より細胞近傍に局所的に添加するための分散液は BAT 濃度 2 mM、灌流液全体に 添加するための分散液は BAT 濃度 0.2 mM に調整した。

細胞を 2 ml の電気生理実験用培地中、室温でインキュベートした。

この実験用に用いた培地は、最終的に NaOH 添加により pH 7.4 に調整した、NaCl, 124mM; KCl, 5mM;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2.4mM;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.3mM; glucose 10 mMである。蒸発による影響を防ぐため、電気生理実験用培地は最長でも 40 分 に一度はピペットにより交換した。

BAT は最終濃度が 49  $\mu\text{M}$  となるように添加した。照射光量は 0.47 J/cm<sup>2</sup>、0.94 J/cm<sup>2</sup>、1.57 J/cm<sup>2</sup> の 3 段階とした。

パッチ電極内液は以下の組成とした。(KCl 132 mM, NaCl, 8 mM,  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM, HEPES 30 mM,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  4 mM, GTP 0.3 mM, EGTA 0.5 mM, これを最終的に NaOH 添

加により pH 7.3 に調整したもの)

励起光源は共焦点レーザー顕微鏡(confocal laser scanning microscope, CLSM) MRC-1000 UV (BIO-RAD laboratories 社製)を標準装備している 50mW, 363nm アルゴンイオンレーザーを使用した。顕微鏡フル画面(約  $470\text{ }\mu\text{m} \times 680\text{ }\mu\text{m}$ )の  $1/16$  (X軸、Y軸方向それぞれ  $1/4$ 、 $117\text{ }\mu\text{m} \times 170\text{ }\mu\text{m}$ )を前述のレーザー光でスキャンする。このエリアに、パッチされたターゲット細胞全体が入るように設定した。レーザー光は 50 mW が 100 %出力である。スキャン速度により、照射時間は  $1/16$ ,  $1/4$ ,  $1/32$  秒から選択した。また、フィルタによる減光も使用した。ズーム機能を使用した場合は通常のエリアに比べ光を狭いエリアで集中してスキャンするため、単位面積あたりの光量はズーム倍率の二乗に比例して増加することになる。実際に細胞に励起光が届くまでにはコラーゲンコートディッシュのプラスチックを透過するため、実際には減光を考慮する必要がある。

また、励起光照射は電気生理記録と連動した TTL 信号を光源に適宜送信し、光照射と電氣的測定の同期をとった。

電気生理実験の開始にあたり、細胞膜電位は  $-80 \sim -60\text{ mV}$  の間に維持されていた。パッチ電極の抵抗は  $3 \sim 4\text{ M}\Omega$  で、前述の電極内液を充填して用いた。

細胞膜電位測定用のアンプは Axopatch 1-D (Axon Instruments 社製)を使用した。膜抵抗は  $350\text{ M}\Omega$ 、 $1\text{ Hz}$  の矩形波過分極電流を通電した際の膜電位変化より算出した。通電量 ( $0.1$  または  $0.15\text{ nA}$ ) は通電による膜電位変化が  $30\text{ mV}$  を越えないように選択した。なおこの実験条件下では PC12 細胞は活動電位を発生しなかった。測定された電位・電流の値を Axoscope ver.1.1 ソフトウェア (Axon Instruments 社製)により解析した。この結果を図 9 に示した。

図 9 において横軸は時間経過を示している (単位; 秒)。縦軸は上段が光照射前の値を  $100\%$  として規格化した場合の細胞膜抵抗 (単位; %) を、下段が細胞膜電位 (単位; mV) をそれぞれ示している。膜抵抗はイオン透過阻止能、膜電位は各種膜間イオン輸送系の活動による膜の能動的イオン輸送能及びイオン透過阻止能を反映している。

$1.57\text{ J/cm}^2$  の光照射量は、A がもっとも弱く ( $0.47\text{ J/cm}^2$ ) B が 2 番目に弱く ( $0.94\text{ J/cm}^2$ )、C がもっとも強い ( $1.57\text{ J/cm}^2$ )。A においては細胞膜抵抗・膜



電位とも光照射後に若干の変動があるものの、大きな変化はなかった。Bにおいては、光照射後に数秒の誘導期間において細胞膜抵抗減少・膜電位脱分極が生じた。また、この条件下では、30秒後に光照射前の抵抗・電位に回復することが観察された。これはすなわち膜がいったん破壊された後に生体反応により膜の修復がなされたものと考えられる。Cにおいては光照射後に数秒の誘導期間において8秒程度で細胞膜抵抗・膜電位とも消失し、その後一定値をとった。これはすなわち膜がいったん破壊された後に修復反応がおこっていない、すなわち不可逆的な膜破壊が生じたものと考えられる。

[実施例4] 微小ガラスピペットによる標的細胞へのBATの吹き付け処理  
マイクロマニピュレーターに保持された微小ガラスピペットにマイクロインジェクション装置を接続し、微小ガラスピペット内部に光増感剤BAT分散液(BAT濃度2mM、水溶媒)を充填した。このガラスピペット先端が、パッチ電極に接続され膜電位・膜抵抗を計測する細胞の近傍200 $\mu$ m以内になるように配置した。微小ガラスピペットを加圧することによりBAT分散液を放出し、目的となる細胞膜にBATを付着させた。レーザー光を実施例3と同様に照射したところ、細胞膜電位の脱分極が観察された。

[実施例5] 部位特異的膜破壊を利用したマイクロインジェクション処理  
膜破壊を利用した物質導入をマイクロインジェクション処理に適用した。マイクロインジェクション処理の成否を判定するため、インジェクション液に水溶性蛍光色素Lucifer Yellow CH (LY) を添加した。インジェクション処理後、蛍光顕微鏡によって細胞内にLY由来の黄色蛍光が観察された場合をインジェクション処理が成功したものと判定した。インジェクション液中の光増感剤BATの有無、およびBAT励起光照射の有無によって、細胞へのLYインジェクション成功率がどのように変化するか評価を行った。

LYはマイクロインジェクションに用いられる低毒性の蛍光色素であり、細胞分裂の際、娘細胞に移行する特徴がある[Cell & Tissue Res., 234, 309-318 (1983)]。LYは水溶性が高く、拡散性に優れるため、神経系の細胞蛍光ラベル剤としても用いられる[Cell & Tissue Res., 254, 561-571 (1988)]。また、細胞間の液-液接合であるギャップ接合[「新生理学体系7 発生・分化の生理学 第4章 細胞間連

結の発生 I. 電氣的結合」、医学書院 (1991)]を通じて、このギャップ接合で連結された細胞間を分単位で迅速に移行する特徴がある。使用した PC12 細胞についても、同様のギャップ接合形成のマーカーとして用いられた報告がなされている [J. Neurosci., 14, 3945-3957 (1994)]。LY を注入された細胞は過大な LY 励起光照射に対しては細胞死を引き起こす [Science, 206, 702-704 (1979)] が、インジェクション液中の BAT の有無、および BAT 励起光照射の有無によって、細胞へのインジェクション成功率がどのように変化するか、比較評価した。

通常、マイクロインジェクションを成功させる場合には、先端開口部の直径が数百ナノメートルであるガラス細管 (キャピラリー) を高速で細胞に接触させ、物理的に、瞬時に細胞膜、あるいは核膜を貫通・穿孔する必要がある。実験においてはプログラム動作可能な電動マイクロマニピュレーター (Eppendorf 社製、Micromanipulator5171) および電動インジェクター (Eppendorf 社製、Transjector5246) を使用し、キャピラリーの接触速度を任意の値に設定することが可能であった。また、インジェクション用キャピラリーは同装置用に市販された量産品 (Eppendorf 社製、FemtoTips) を用いた。電動マイクロマニピュレーターによりインジェクション作業が再現性よく自動化されたこと、また自作品に比較して形状の均一性が高い市販のキャピラリーを使用したことから、インジェクション成功効率についての統計的処理を行うことが可能になった。なお、マイクロマニピュレーターは蛍光顕微鏡 (オリンパス光学工業製、IX70 蛍光顕微鏡仕様) に装備した。光増感剤の励起光源としては、同顕微鏡内蔵の落射蛍光光源である 100 W 水銀ランプの光を紫外線励起フィルタセット (オリンパス光学工業製、U-MWU ミラーユニット) で透過処理した紫外光を使用した。光照射面積は顕微鏡の蛍光光学系の絞りによって直径約 100  $\mu\text{m}$  とした。また細胞内に LY が注入されたことを判定するための LY 励起光源としては、同じく 100 W 水銀ランプの光を紫色光励起フィルタセット (オリンパス光学工業製、U-MWBV ミラーユニット) で透過処理した紫色光を使用した。

このような系では、光増感剤 BAT がキャピラリーに接した直径 0.5  $\mu\text{m}$  の領域に集中され、キャピラリーが接している領域以外については、BAT は拡散によって速やかに希釈された。そのため、キャピラリー接触部では BAT による光増感作

用がインジェクション液の BAT 濃度  $100 \mu\text{M}$  に細胞に作用する BAT 濃度としては、キャピラリー接触部の濃度に比較するとその他の部位の濃度は無視できると思われる。

インジェクション作業に際しては、キャピラリー接触速度  $1000 \mu\text{m s}^{-1}$  で細胞にキャピラリーが刺入できるようにマニピュレーターの動作範囲を設定した上で、キャピラリーを  $7 \mu\text{m s}^{-1}$  の低速度で動作させ、物理的に細胞膜を穿孔しないようにキャピラリーを細胞膜に接触させた。この条件で、BAT による光増感作用によって細胞のインジェクション成功効率がどのように変化するか比較を行った。

光増感剤 BAT は六車らにより合成・提供されたものを使用した。以下の試薬については市販品を使用した。

塩化ナトリウム ( $\text{NaCl}$ 、キシダ科学製)、塩化カリウム ( $\text{KCl}$ 、キシダ科学製)、リン酸水素二ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、和光純薬製)、リン酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、和光純薬製)、蛍光マーカー Lucifer Yellow CH, Lithium salt (LY、ex.428 nm, em.536 nm. Molecular Probes 社製)

インジェクション液の組成は以下の最終濃度になるように各成分を純水に溶解、調整した。(光増感剤 BAT  $100 \mu\text{M}$ 、 $\text{HCl}$   $50 \mu\text{M}$ 、蛍光マーカー LY  $2 \text{ mM}$ 、 $\text{NaCl}$   $8 \text{ g/l}$ 、 $\text{KCl}$   $0.2 \text{ g/l}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $1.15 \text{ g/l}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.2 \text{ g/l}$ )

なお BAT を含まない対照処理用のインジェクション液も調整した。

インジェクション対象細胞には神経系株化細胞 PC12 を使用した。同細胞は理化学研究所細胞開発銀行より入手し、実施例 1 に従って培養された。なおインジェクション処理される細胞は  $\phi 35 \text{ mm}$  コラーゲンコート済ディッシュ (岩城硝子製) へ細胞密度  $90000 \text{ cell / ディッシュ}$  で継代培養を行った。細胞は炭酸ガスインキュベーター (Forma Scientific 社製) により気温摂氏  $37^\circ\text{C}$ 、二酸化炭素  $5\%$ 、空気  $95\%$ 、湿度  $100\%$  の環境下で培養された。

インジェクション処理に際しては、Hibernate A Media (Hib-A、Gibco BRL 社製) [NeuroReport, 7, 1509-1512 (1996)] にウマ血清 (Gibco BRL 社製)  $10\%$ 、ウシ胎児血清 (三菱化学製、中標津牛準胎児血清)  $5\%$ 、L-グルタミン酸 (Gibco BRL 社製)  $7.35 \text{ mg/l}$ 、L-グルタミン (Gibco BRL 社製)  $2 \text{ mM}$  を添加した組成のインジェクション処理用 Hib-A 培地を用いた。なお、ウマ血清については  $56^\circ\text{C}$ 、30 分の

加熱により熱非働化処理したものを使用した。

以上の溶液調整には純水製造装置 Biocel A10 / Elix 10 (MILLIPORE 社製)により精製された水を使用した。

インジェクション処理手順の概略を 図 10 に示す。以下はその補足である。

- 1) インジェクション処理時には細胞が培養されたディッシュから NeuroBasal 培地の全量 3 ml を除去し、ディッシュ上の細胞を Phosphate Buffered Saline, 7.4 Ca, Mg 不含 (PBS、GIBCO BRL 社製) 1 ml を流すことによって洗浄した。この PBS 全量を除去し、新たな PBS 1 ml で同様に洗浄を行った後、PBS 全量を除去し、最終的にディッシュはインジェクション処理用 Hib-A 培地 2 ml によって充たされた。細胞はこの Hib-A 培地により維持された。
- 2) 使用したマイクロマニピュレーター装置においては、インジェクション実行時にキャピラリー先端部が細胞に刺入可能であるように、キャピラリー先端がディッシュ面に最接近する限界位置 (Z limit) を設定することが必要であった。この Z limit 位置がディッシュ上の細胞核の位置と一致する様にマニピュレーターを設定した。
- 3) キャピラリー位置を Z limit の上方 30  $\mu\text{m}$  に変更し、その他の条件についてもアプローチ速度入力値 700  $\mu\text{m s}^{-1}$  (実効値 1000  $\mu\text{m s}^{-1}$ )、インジェクション時間 1.1 s (実効値 1.0 s) に変更した。この条件下で 10 細胞以上に対し、成功率 80% 以上の確率で通常の物理的なマイクロインジェクション処理が可能となるように Z limit 位置を調整した。成功率が低い場合には Z limit 位置を再設定した。
- 4) キャピラリー位置を Z limit の上方 10  $\mu\text{m}$  に変更し、アプローチ速度入力値 5  $\mu\text{m s}^{-1}$  に設定、インジェクション時間を 124 秒 (実効値 120 秒) に変更した。
- 5) 顕微鏡の落射蛍光光源を LY 蛍光の観察に適した紫色光励起 (U-MWBV ミラーユニット) フィルタセットに切り替えて、インジェクターの Clear 機能 (7000 hPa をキャピラリー内のインジェクション液に加圧し、キャピラリーの詰まりを除去する) により、LY のキャピラリーからの放出を確認した。キャピラリーが詰まっていた場合は新しいキャピラリーに交換した。
- 6) インジェクション圧の設定はキャピラリー先端から LY が徐放される程度の圧力

に設定した。なお、インジェクション処理においてキャピラリー先端から LY の徐放が認められるために必要な圧力は、キャピラリー先端の状況によって 10 hPa から 1000 hPa と大きなばらつきがあったため、適宜圧力の補正を行った。このばらつきの原因は、キャピラリー先端への細胞膜片や微小なごみの付着にあった。キャピラリー先端にこれらの付着物があった場合には、インジェクション液に同じ圧力を印加した場合であっても有効なインジェクション液の放出量が大きく変化したため、補正を行う必要があった。

7) 顕微鏡視野において、細胞中心にキャピラリー先端が位置するように細胞とキャピラリーの位置を調整した。BAT を励起するため、適宜、落射蛍光光源を紫外光励起(U-MWU ミラーユニット)フィルタセットに切り替えて紫外光を照射した。また、励起用紫外光以外の光による影響を抑制するため、細胞観察用の透過光源は遮断した。

8) マニピュレーターのインジェクション処理スイッチを押した。キャピラリーが細胞に接し、その位置においてインジェクション液を設定時間、設定圧力で放出した後に、キャピラリーは元の位置に戻る、以上のプロセスが自動的に実行された。

9) インジェクション処理終了後、顕微鏡の落射蛍光光源のフィルタを紫外光用から紫色光用 (U-MWBV ミラーユニット)に切り替え、LY 励起光を照射し、細胞が LY 染色されているか確認した。死細胞にインジェクションを行った場合は速やかに LY が細胞膜から漏出して蛍光が消失するので、そのような細胞はデータから除いた。

10) 細胞観察用の透過光源を再び開き、細胞を観察しつつ次の細胞にキャピラリー先端位置を合わせる。

11) 5) に戻り、繰り返しインジェクション処理を行った。

インジェクション処理後、ディッシュからインジェクション処理用 Hib-A 培地を除去し、PBS 1ml による 2 回の洗浄を行った後、培養用の NeuroBasal 培地 3ml に戻す。以降は通常の手順に従い培地交換を行う。

なお、インジェクション処理後の NeuroBasal 培地には抗生物質ペニシリン・ストレプトマイシン混合物を添加し、カビやバクテリアによる細胞培地の汚染を防止

した。

光増感機構によるマイクロインジェクションの成功確率を評価する際には、ピペット先端の物理的剪断力が寄与しない条件でインジェクションを行う必要があった。適切なインジェクション処理のためにはキャピラリーの到達限界位置( $Z$  limit)の調節が重要である。そのため、設定した $Z$  limitにおいて通常のアプローチ速度である  $1000 \mu\text{m s}^{-1}$  で成功確率80%以上でインジェクション可能であることを確認した上で、アプローチ速度を  $7 \mu\text{m s}^{-1}$  に低下させた。このアプローチ速度では、キャピラリー先端はインジェクション成功時と同じ位置まで到達するものの、細胞膜をほとんど貫通できない。このような物理的剪断力による膜穿孔が困難なアプローチ条件下において、光増感機構を利用したインジェクション成功率を比較した。この結果を図12に示した。

図12において横軸はインジェクション処理条件、縦軸はインジェクション成功率(単位；%)を示す。

BATを含むインジェクション液を使用した場合には、紫外光を2分照射することで、約80%の確立でインジェクションが成功した(30細胞に実施し、25細胞で成功、83%)。

一方、細胞にキャピラリーが接触したまま光照射を行わなかった場合は、細胞内へのLY拡散はほとんど認められなかった( $n=30$ , 4 cell 成功、13%)。またBATを含まないインジェクション液では、UV光照射の有無によらず、キャピラリーアプローチ速度が  $7 \mu\text{m s}^{-1}$  の条件下ではインジェクション成功率は、0~10%に留まった(UV光照射実行の場合、30細胞に実施し、0細胞で成功、0%) (UV光照射を行わない場合、30細胞に実施し、3細胞で成功、10%)。

通常の物理的剪断力によるマイクロインジェクション処理を施された細胞と、光増感マイクロインジェクション処理された細胞について、インジェクション処理後の細胞生存率の比較を行った。

細胞にはマイクロインジェクションによりLYを注入した。細胞膜が崩壊した死細胞においては、LYは速やかに拡散し染色は失われる[Cell, 14, 741-759 (1978)]。このことから、インジェクション処理された細胞のLY保持率を細胞の生存率を示す指標として、インジェクション処理を行ってから、3日後、6日後の生存率を

比較した。この結果を図13に示した。

図13において横軸は、インジェクション処理後の経過日数（単位；日）。縦軸は生存率（単位；％）である。

対照例となる通常のLYインジェクション、LY-BATインジェクションではインジェクションから3日目の観察の時点で細胞生存率は30%以下であった(LY:17%、BAT+LY:30%)。一方、光増感インジェクションを行った細胞群では、インジェクション処理から3日、6日経過しても約90%の細胞が生存していた(BAT+LY+UV:91%)。なお、これら3通りのインジェクション条件のいずれにおいても3日目、6日目の間ではLY保持率に変化は認められなかった。

今回実施したマイクロインジェクション処理においては、BATを含まないインジェクション液を使用した場合や、光照射を行わなかった場合は1割程度しか細胞をLY染色できなかった。そのような対照処理に対して、BATを含むインジェクション液を使用し、光照射を行った場合はLY染色の成功率が約8割と有為に高かった。これはBATが光照射によって細胞膜の穿孔に寄与したことを示している。

またインジェクション処理後、通常の膜剪断的インジェクションでは細胞生存率は2～3割であった。光増感インジェクションを行った細胞では細胞生存率は約9割であったことは、光増感インジェクションが細胞へ与えるダメージの低さを示している。

細胞に注入されたLYは、迅速に細胞質に拡散し細胞を染色する。しかし、細胞膜のイオンバリア能が消失した死細胞の場合、LYは細胞に注入されても1～2秒で細胞外に拡散してしまう。この迅速なLYの拡散は、細胞間の液々連絡路であるギャップ接合を通じても行われることが報告されている[Cell & Tissue Res., 234, 309-318 (1983)] [J. Neurosci., 14, 3945-3957 (1994)]。LYの迅速な拡散についてのこのような報告を考慮すると、インジェクション処理後もLYが保持されている細胞においては、穿孔された細胞膜がインジェクション後に再閉塞しているものと考えられる。この迅速な膜の修復は、実施例3において、膜電位・膜抵抗の回復が光照射後数分以内に認められることによって支持される。

この膜の閉塞機構については、2通りの機構が考えられる。一つは細胞の抗酸化機構による、酸化した膜の代謝的修復にるものである[J. Neurochem., 68,

1904-1910 (1997)]。もう一方は、生化学的な膜の修復ではなく、膜脂質の流動性によって[Proc.Natl.Acad.Sci., 69, 2056-2060 (1972)] [J.Am.Chem.Soc., 94, 4475-4481 (1972)]損傷部位が閉塞される機構である。

本インジェクション処理系においては、キャピラリーを細胞から引き離すと、増感剤がほとんど作用しなかった細胞膜成分が流動することで膜の穿孔部位を閉塞したものと思われる。その理由として、単に物理的な細胞膜穿孔の際も、同様の速やかな細胞膜閉塞が観察されることが上げられる。先に、微小ガラスピペットやパッチピペットによって物理的に細胞膜を穿孔する場合について述べた。このような物理的穿孔の後、ピペット除去後に細胞膜の穿孔部が閉塞することも多いが、その迅速な再閉塞は膜脂質の流動性・自己組織性によるものと考えられている[「生体膜と生体エネルギー〔第3版〕 7. 生体膜の再構成」、東京大学出版会 (1985)]。

生化学的な代謝による膜回復は、少なくとも数秒のオーダーでは膜の再閉塞には至らないものと考えられる。無論、生化学的な膜の修復も生ずると考えられるが、こちらの機構は数時間から数日のオーダーで酸化された細胞膜を正常化するものと考えられる。

光増感インジェクションによってLYが細胞に注入されたということは、細胞への電極接続技術を考慮すると、非常に意義深いものが有る。先に記述した様に、LYは直接注入された細胞のみならず、ギャップ接合で連結された隣接細胞にも浸透し、染色することが可能である[Cell & Tissue Res., 234, 309-318 (1983)][J. Neurosci., 14, 3945-3957 (1994)]。

ギャップ接合の機能の一つに、細胞間の電氣的接続が上げられる[「新生理学体系 7 発生・分化の生理学 第4章 細胞間連結の発生 I. 電氣的結合」、医学書院 (1991)]。心筋細胞等は、多数の筋肉細胞がギャップ接合を介して電氣的に連結されることにより、電氣的な刺激に対して、筋組織全体として同期のとれた収縮反応を生ずる。

今回のBAT光増感機構インジェクションによってLYによる細胞の染色が可能であったことから、キャピラリー内液と細胞質の間に少なくともギャップ接合程度の電氣的接続が達成されていたものと考えられる。すなわち、この結果は物理的



な穿孔によらず、光照射によって電氣的な接続が達成されたことを示している。

光増感剤 BAT をインジェクション液に添加し、インジェクション処理を行った結果、物理的な剪断力によらない光制御穿孔技術の可能性が示された。更にこのような光増感インジェクションを行った細胞は、通常の物理的剪断力によるマイクロインジェクションに比較して、すなわち、インジェクションが細胞に及ぼす傷害を抑える手段として、影響の技術上の優位を示すものである。

#### 【実施例 6】 原子間力顕微鏡走査プローブを利用した膜破壊部材の製作

エッチングにより加工された市販のシリコン単結晶走査プローブ(Nanosensors 社製、シングルビームシリコン単結晶走査プローブ、カンチレバー長さ約 130  $\mu$ m) の探針側(測定面)に厚さ 220nm の金(Au)をスパッタリング(芝浦製作所、スパッタ作業圧力 0.3 Pa, 出力 100 W)により鍍金した。測定側金属端子および機器接続側金属端子以外の領域をスパッタリングにより厚さ 100 nm の二酸化珪素で絶縁包埋した。この走査プローブを、原子間力顕微鏡(Nanoscope III, Digital Instruments 社製)に装備し、機器側金属端子を電気穿孔装置(Gene Pulser, BIO-RAD laboratories 社製)の負極に接続した。電気穿孔装置の正極を AFM サンプルプレート上の金属基板(銅、白金等)に接続し、絶縁破壊前、すなわち二酸化珪素で絶縁包埋された状態の探針を基板に接触させた。なお 3 M $\Omega$  抵抗を走査プローブ基板と電気穿孔装置の間に直列に接続し、走査プローブの絶縁破壊後の過剰な電流による同プローブの破壊を防止した。電気穿孔装置の蓄電容量を 0.25  $\mu$ F、電圧 50 V に設定し、基板と走査プローブ探針部の間を瞬間的に通電した。この通電により、探針先端部の絶縁が破壊され、探針先端部の金属層を露出させた。以上により、走査プローブの探針先端部のみが電極として露出した微小金属電極が完成した。

更に BAT 2 mM 酸性水溶液(pH 3.0)にこの微小金属電極の探針先端部を浸した。この作業により電極上に BAT が吸着固定した。最終的に蒸留水によって電極を洗浄することにより余分な BAT を除去した。

以上のプロセスにより、原子間力顕微鏡の走査プローブの機能と、電極機能をもつ膜破壊部材を作成した。

これらの結果から、光増感剤のピンポイント使用による小型細胞への各種デバ

イス接続・埋め込みにおいて、光照射による穿孔制御の可能性が示された。

#### 産業上の利用の可能性

物理的剪断力以外の膜変性反応を制御する技術を開発した。この結果、膜変性や膜穿孔が従来よりも容易に行えるようになった。例えば、マイクロインジェクション装置、マイクロマニピュレーター、微小電極等を構成する微小部材で従来細胞膜を貫通することが困難であったものでも、容易に貫通させることができるようになった。また、例えば遺伝子等の細胞内への効率的な導入が可能となった。

## 請求の範囲

1. 特定の刺激により膜変性反応が誘起される特定の化合物を含む薬剤を膜の一部または全部に接触させた後、該刺激を与えることにより該膜の特定の部位を変性または穿孔する方法。
2. 膜が細胞膜、細胞壁、生体膜または人工膜であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。
3. 刺激を与える領域が薬剤を接触させる領域に含まれることを特徴とする請求項 1 または 2 のいずれかに記載の方法。
4. 薬剤を接触させる領域が刺激を与える領域に含まれることを特徴とする請求項 1 または 2 のいずれかに記載の方法。
5. 薬剤が支持体を用いて接触せしめられることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。
6. 特定の刺激が光であり、化合物が光増感化合物であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。
7. 請求項 1 ～ 6 のいずれかの方法を用いて得られる、特定の部位が変性または穿孔された膜または該膜を含む膜構造体。
8. 膜が細胞膜、生体膜または人工膜であることを特徴とする請求項 7 に記載の膜または該膜を含む膜構造体。
9. 膜構造体が細胞、ミセルまたはリポソームであることを特徴とする請求項 7 または 8 のいずれかに記載の膜構造体。
10. 注入を目的とする化合物を含む薬剤とキャリアーとからなる複合体と、請求項 7 ～ 9 のいずれかに記載の構造体とを混合することにより構造体内部に該化合物を注入する方法。
11. キャリアーが液体または固体であることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。
12. 物質が核酸または蛋白質であることを特徴とする請求項 10 または 11 のいずれかに記載の方法。
13. 支持体と、この支持体の表面の少なくとも一部に形成した、物理的剪断力

以外の膜変性力を有する膜変性反応促進部位とを含む、膜の特定の部位を変性または穿孔することを目的とする膜破壊部材。

14. 支持体が棒状、管状、針状、または球状であることを特徴とする請求項13に記載の膜破壊部材。

15. 膜変性反応促進部位に膜変性反応を生じせしめる化合物が塗布または固定されていることを特徴とする請求項13または14のいずれかに記載の膜破壊部材。

16. 膜変性反応が活性酸素種の直接・間接的な生成反応により開始される膜成分の連鎖的な過酸化反応を利用するものであることを特徴とする、請求項15に記載の膜破壊部材。

17. 膜変性反応が、特定の刺激および反応前駆物質により誘起され膜の変性または破壊を生じせしめる反応を含む反応であることを特徴とする請求項15または16のいずれかに記載の膜破壊部材。

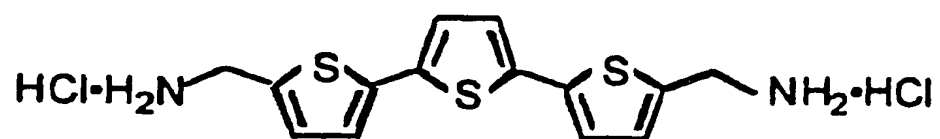
18. 特定の刺激が光で、反応前駆物質が光増感化合物であることを特徴とする請求項17に記載の膜破壊部材。

19. 膜の変性または破壊後、支持体が該膜を貫通し、貫通した該膜が該支持体と密着して接触することを特徴とする請求項13～18のいずれかに記載の膜破壊部材。

20. 膜が細胞膜、生体膜または人工膜であることを特徴とする請求項13～19のいずれかに記載の膜破壊部材。

1 / 13

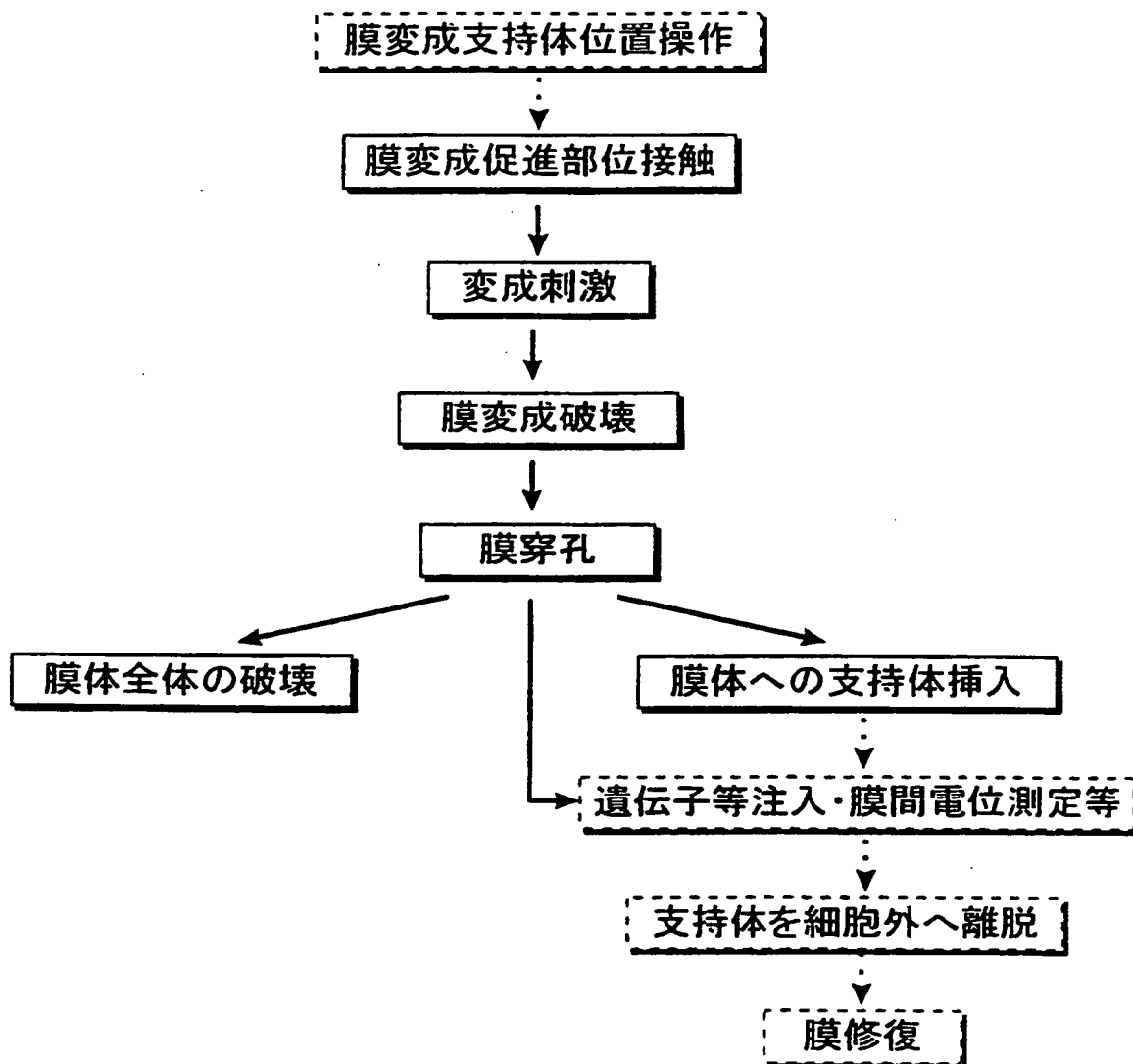
☒ 1





2 / 13

図 2



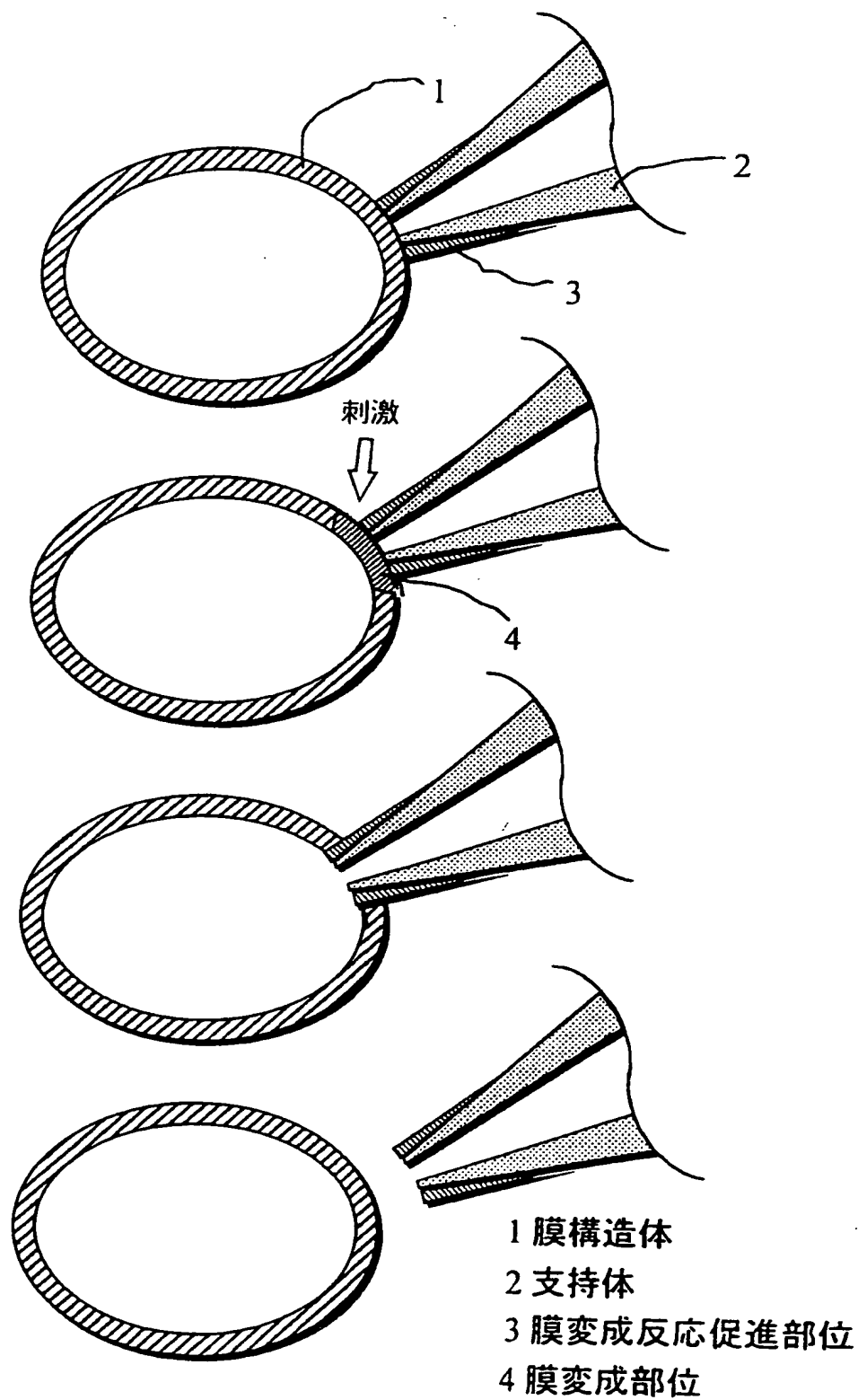
膜穿孔技術フローチャート





3 / 13

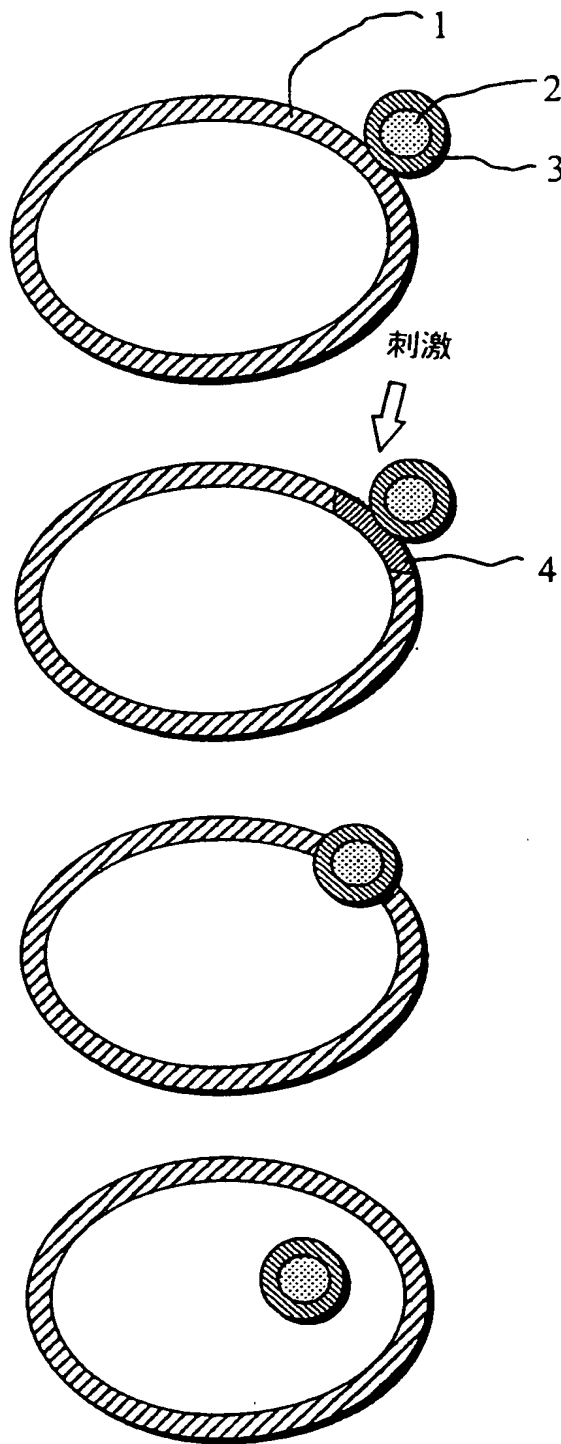
図 3





4 / 13

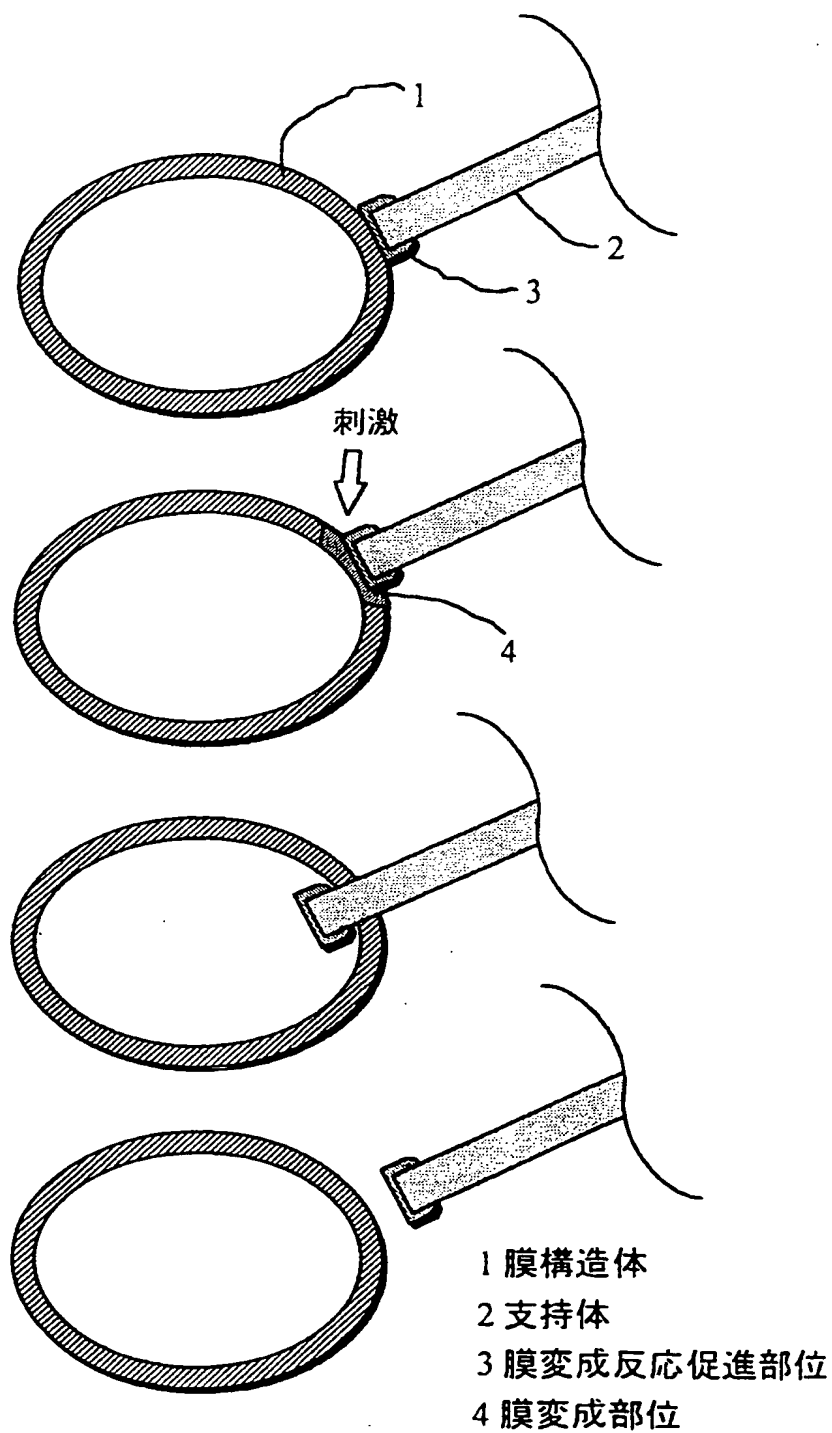
図 4



- 1 膜構造体
- 2 支持体
- 3 膜変成反応促進部位
- 4 膜変成部位



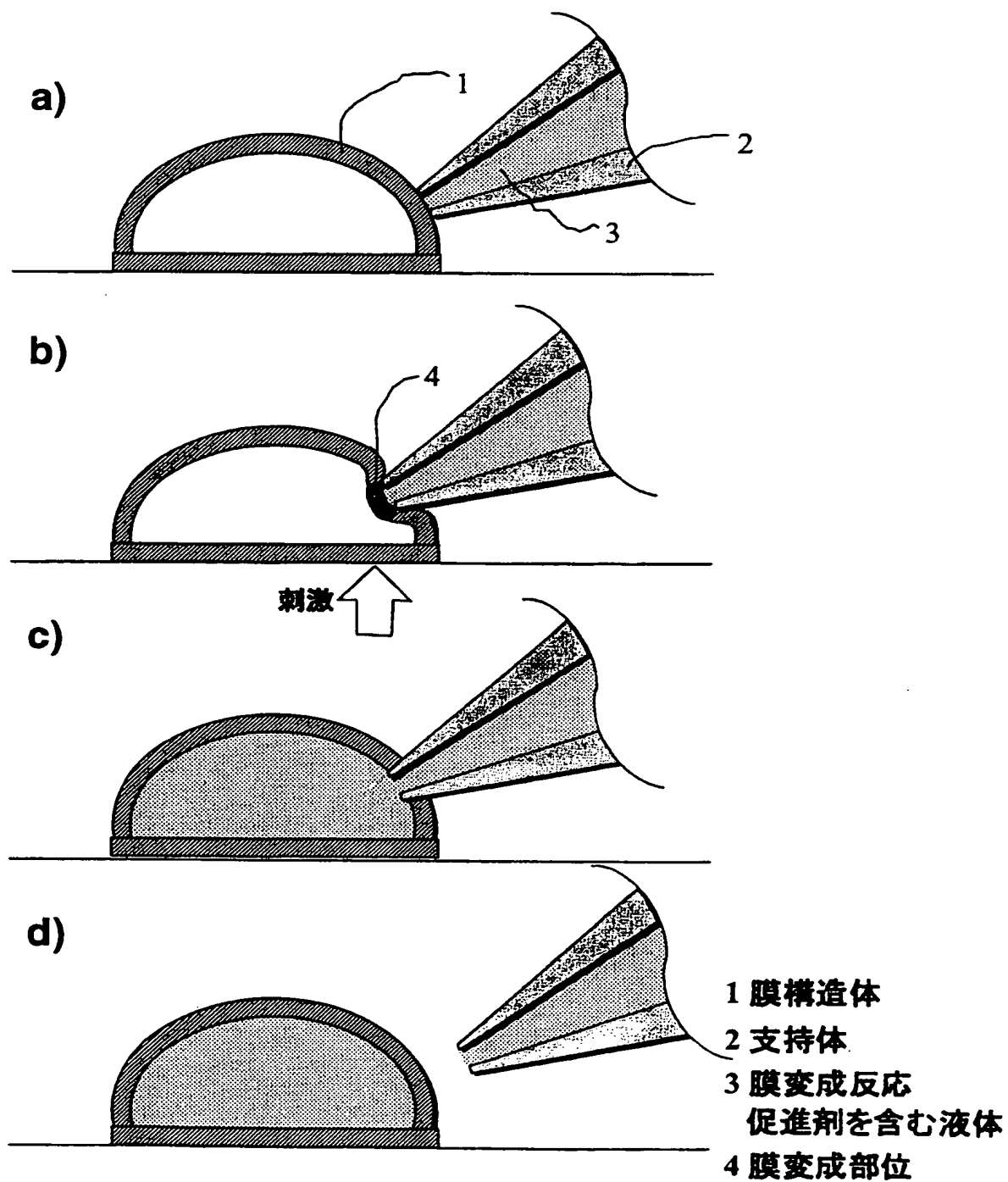
図 5





6 / 13

図 6

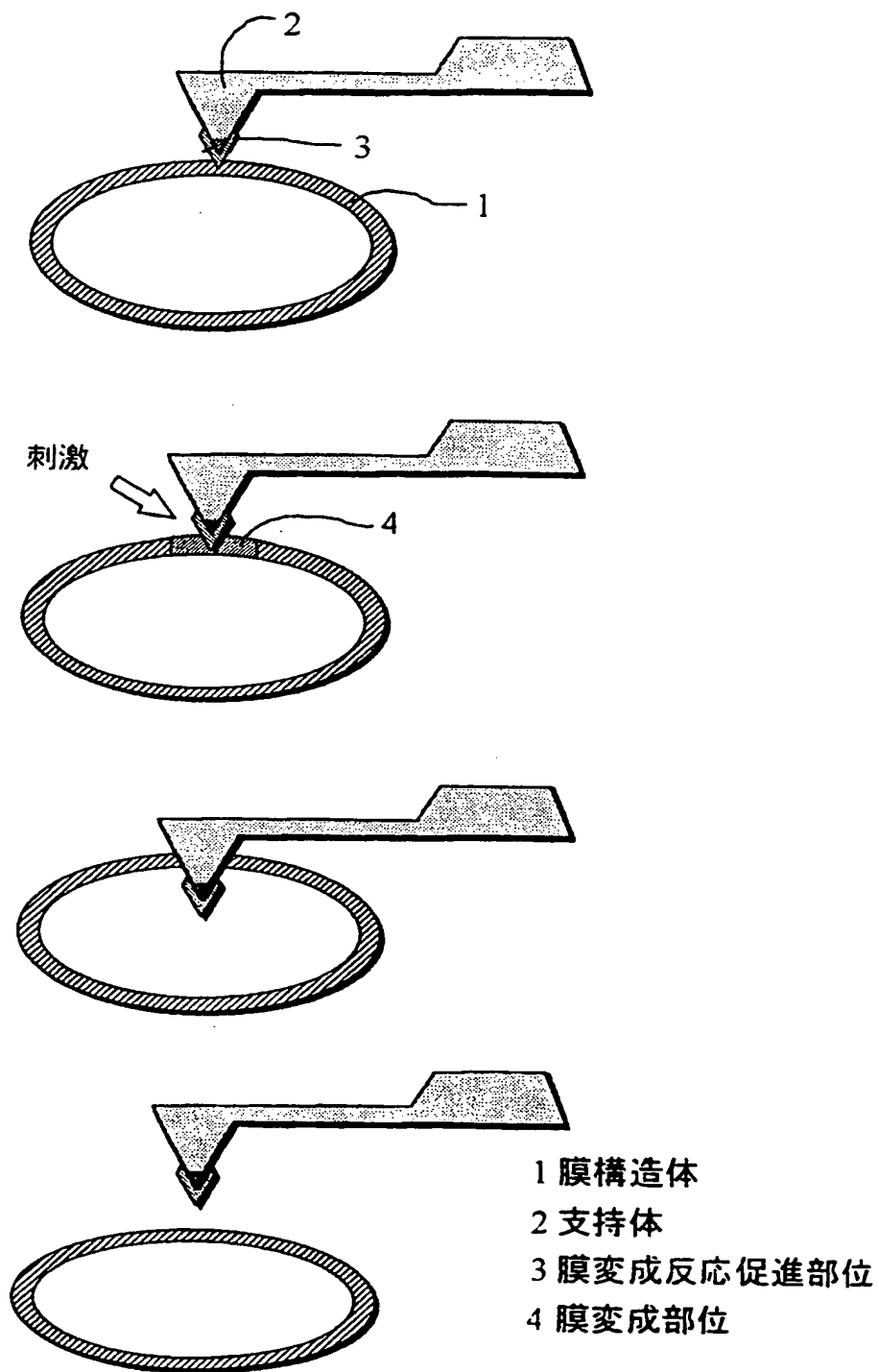






7 / 13

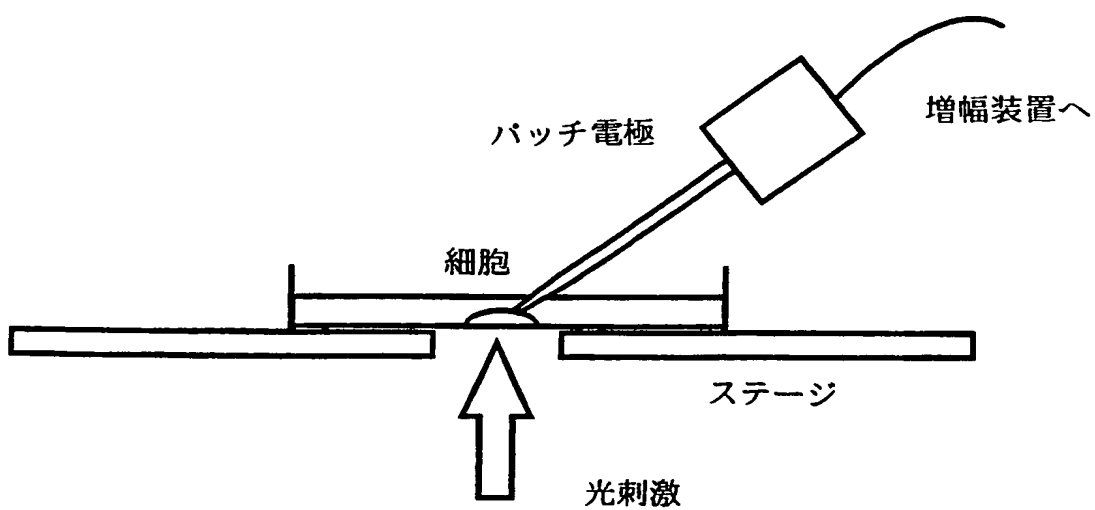
図 7





8 / 13

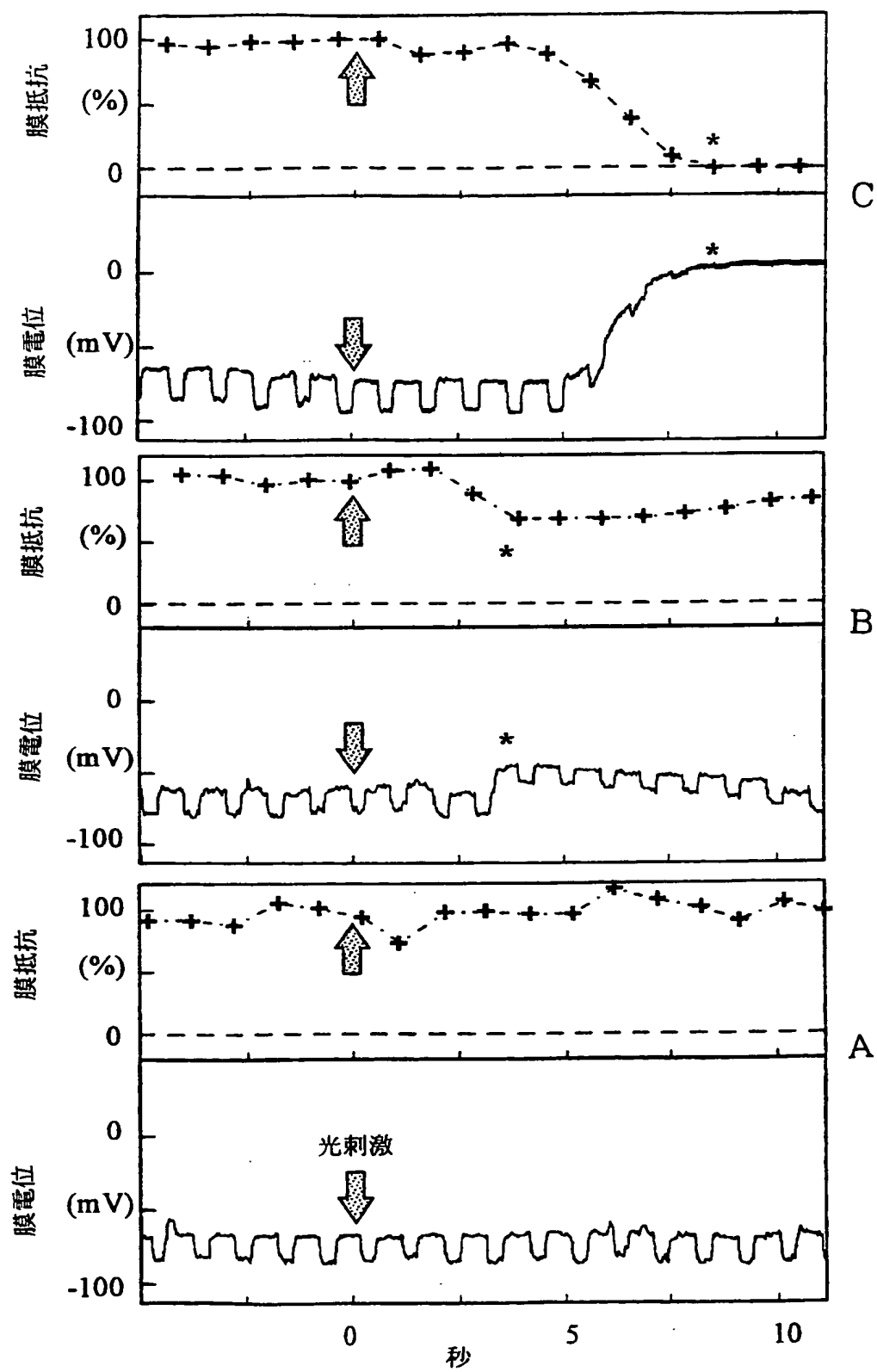
図 8





9 / 1.3

図 9





10/13

図10

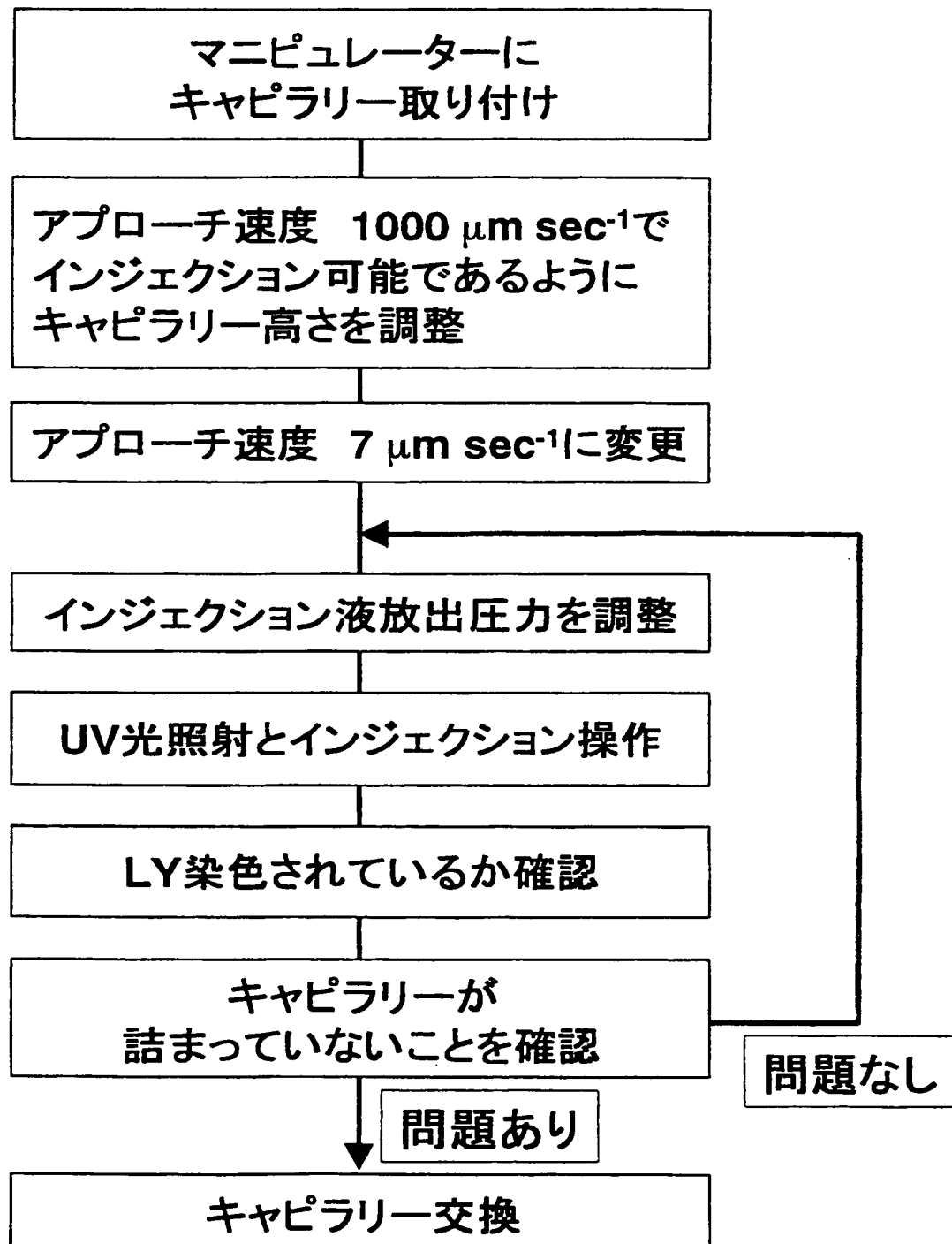
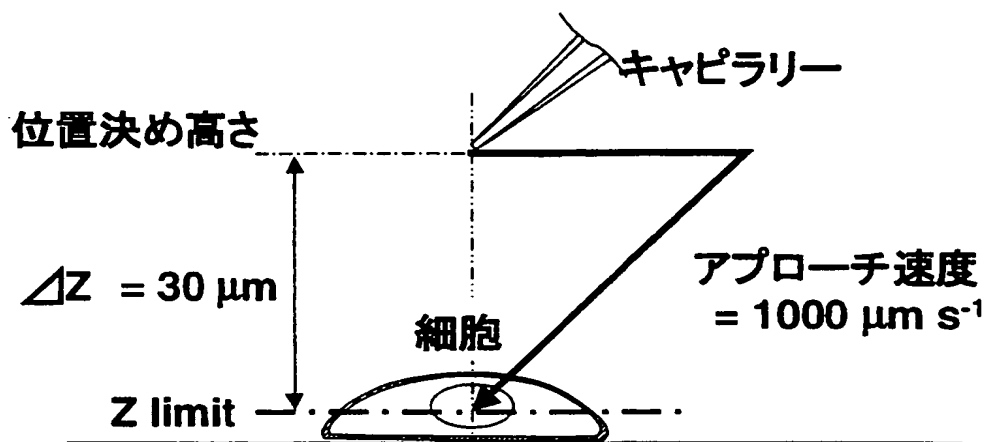


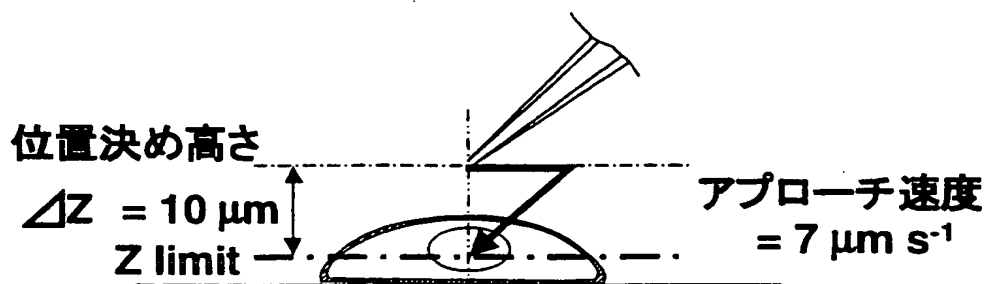




図 11



- 1) 通常のマイクロインジェクションを行い、Z limitが適切に設定されていることを確認する。

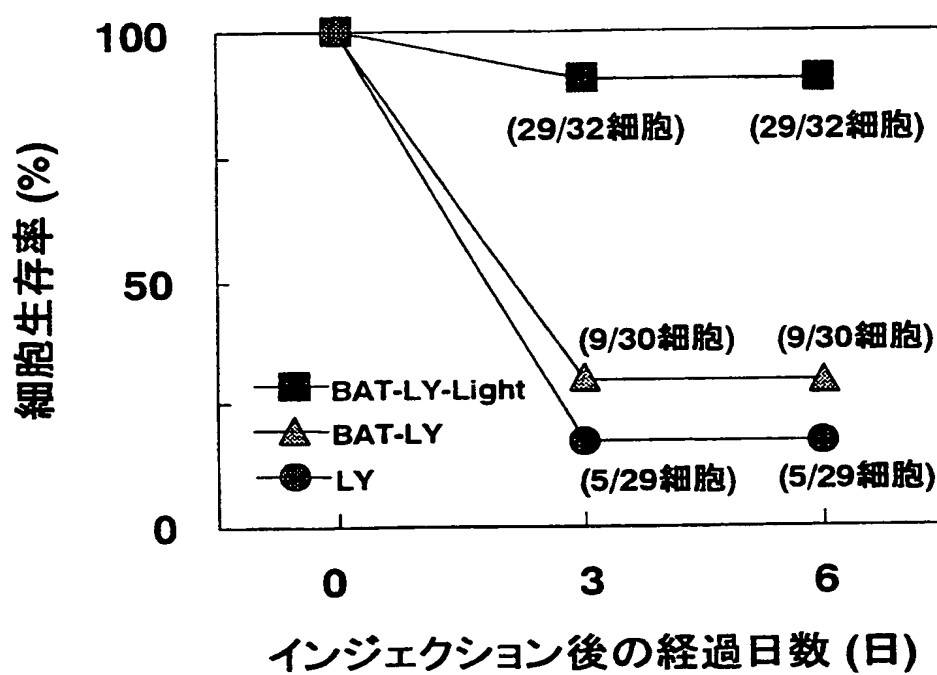


- 2) 刺入困難な速度でアプローチするように設定を変更し、光増感作用によるインジェクション効率への影響を評価する。



12 / 13

図 12



BAT-LY-Light : LY+BAT含有液、光増感インジェクション、32細胞に実施

BAT-LY : LY+BAT含有液、通常インジェクション、30細胞に実施

LY : LY含有液、通常インジェクション、29細胞に実施



1

2

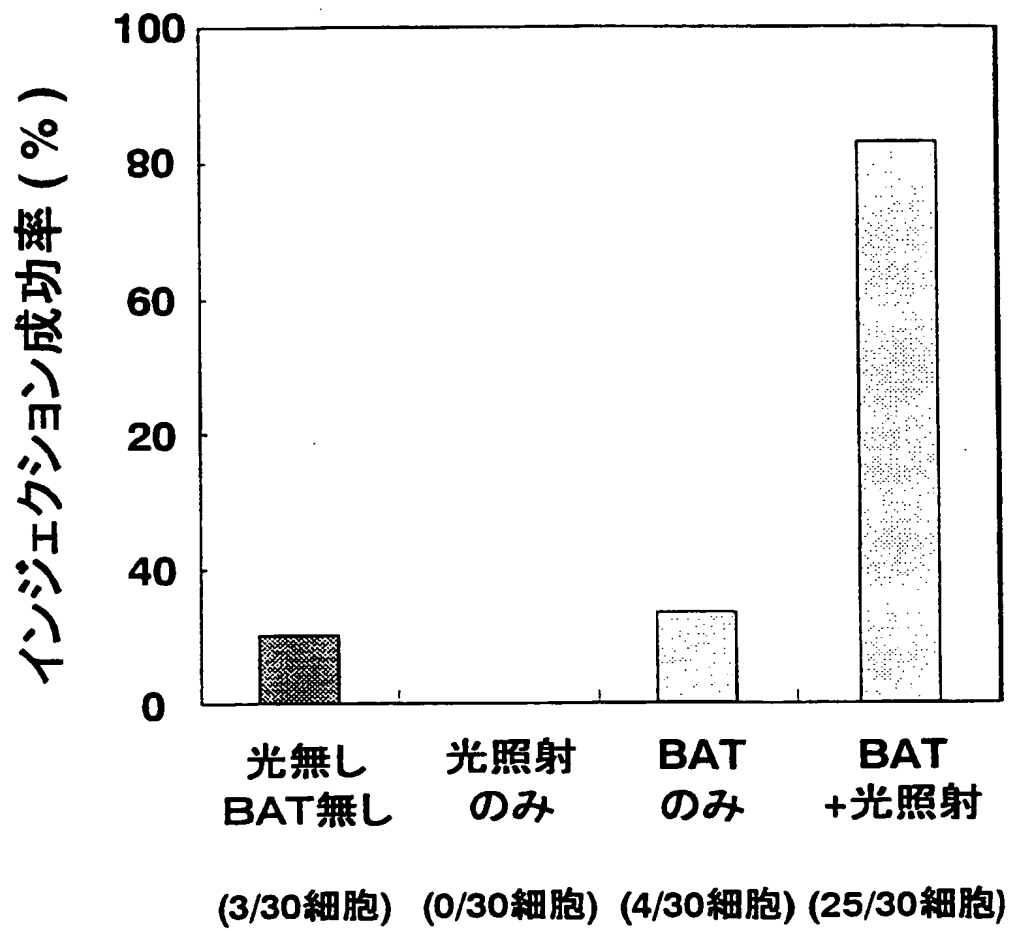
3

4

5

13 / 13

図 13





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/01223

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12M1/00, C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> C12M1/00, C12N5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB, 2209468, A (The University of Salford), 17 May, 1989 (17. 05. 89), Pages 6, 16 to 18 (Family: none)	1-20
A	JP, 60-83583, A (The Institute of Physical and Chemical Research), 11 May, 1985 (11. 05. 85), Full text ; Figs. 1, 4, 5 & EP, 137504, A & JP, 60083584, A & EP, 137504, B & JP, 87007837, B & JP, 87007838, B & DE, 3483934, G & US, 5013660, A & CA, 1284302, C	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
7 May, 1999 (07. 05. 99)

Date of mailing of the international search report  
18 May, 1999 (18. 05. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.





## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12M1/00, C12N5/06

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12M1/00, C12N5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GB, 2209468, A (The University of Salford) 17. 5月. 1989 (17. 05. 89) 第6頁、第16-18頁 (ファミリーなし)	1-20
A	JP, 60-83583, A (理化学研究所) 11. 5月. 1985 (11. 05. 85) 全文, 第1, 4, 5図 & EP, 137504, A & JP, 60083584, A & EP, 137504, B & JP, 87007837, B & JP, 87007838, B & DE, 3483934, G & US, 5013660, A & CA, 1284302, C	1-20

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 05. 99

国際調査報告の発送日

18.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



**(54) METHOD FOR INHIBITING MULTIPLICATION OF VIRUS**

(11) 60-83582 (A) (43) 11.5.1985 (19) JP  
 (21) Appl. No. 58-192350 (22) 17.10.1983  
 (71) AKIRA KAJI (72) AKIRA KAJI  
 (51) Int. Cl. C12N7/04, A61K31/70, A61K35/74, A61K37/10//C07H21/04(C12N7/04, C12R1:91)

**PURPOSE:** To inhibit the multiplication of viruses, by supplying an oligodeoxynucleotide, etc. having the same structure of RNA sequence as that capable of forming a hybrid with a site of messenger RNA produced in the multiplication of the viruses.

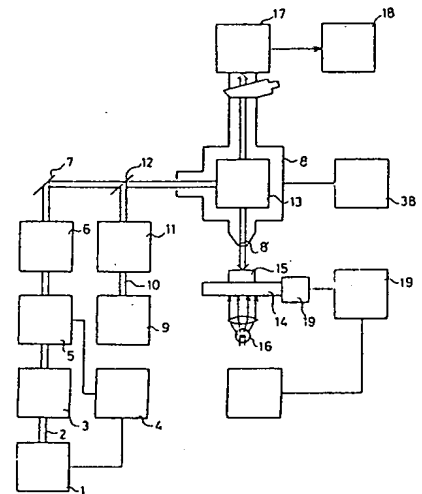
**CONSTITUTION:** For example, the following substance is supplied to a site of messenger RNA produced in the multiplication of double-stranded DNA viruses, e.g. influenza virus or leukemic virus; An oligodeoxynucleotide or polydeoxynucleotide having the same partial structure as that of DNA capable of forming a hybrid with a plus strand RNA as a messenger RNA is supplied to the above-mentioned site. Thus, multiplication of the viruses can be stopped and infection in uninfected cells can be prevented regardless of the DNA viruses and RNA viruses without affecting the uninfected cells in the living body where the viruses are present.

**(54) PERFORATION APPARATUS OF LIVE CELL WITH LASER**

(11) 60-83583 (A) (43) 11.5.1985 (19) JP  
 (21) Appl. No. 58-191378 (22) 13.10.1983  
 (71) RIKAGAKU KENKYUSHO (72) KEIKOU KASUYA(4)  
 (51) Int. Cl. C12N15/00

**PURPOSE:** The titled perforation apparatus having an optical system for projecting laser beams emitted by a laser source to live cells and a monitor for monitoring the conditions of the live cells, and capable of carrying out the ingress of a substance, e.g. DNA, into many cells under the same conditions in a very short time.

**CONSTITUTION:** Perforation laser beams 2 emitted by a perforation laser source 1 are converted into perforation laser beams within the ultraviolet light region in a frequency multiplier 3 and then passed through a shutter 5 and a beam shaper 6 to adjust the beam shape of the laser beams 2. The adjusted laser beams 2 are then directed to a condensing apparatus 8 by a reflecting mirror 7. On the other hand, reference laser beams 10 within the visible light wavelength region are emitted by a reference laser beam source 9 and adjusted to the beam shape of the laser beams 10 in a beam shaper 11, directed to the apparatus 8, superposed on the laser beams 2 and then introduced into the apparatus 8. The laser beams 2 and 10 introduced into the apparatus 8 are then condensed by a condensing lens 8' and projected onto live cells present with a solution containing a substance, e.g. DNA, in a sample holder 15 placed on a stage 14 to perforate the cells. On the other hand, light obtained from the lighting of a lamp 16 from the rear of the sample holder 15 is passed through the condensing lens 8' in the opposite direction to grasp the conditions of the live cells with a TV camera 17 and a monitor TV 18 mounted on the upper part of the apparatus 8.



1: perforation laser source, 3: frequency multiplier, 4: shutter driver, 5: shutter, 6, 11: beam shaper, 9: reference laser beam source, 13: light deflecting means, 17: TV camera, 18: monitor TV, 19: stage position controlling device, 20: oscillator, 38: two-dimensional scanning and controlling means

**(54) METHOD FOR INGRESSION OF SUBSTANCE INTO LIVE CELL**

(11) 60-83584 (A) (43) 11.5.1985 (19) JP  
 (21) Appl. No. 58-191379 (22) 13.10.1983  
 (71) RIKAGAKU KENKYUSHO (72) KEIKOU KASUYA(3)  
 (51) Int. Cl. C12N15/00

**PURPOSE:** To insert a substance efficiently into a very large amount of live cells, by improving the surface conditions of the live cells by irradiation with laser beams to give a state for incorporating the substance, and associating the substance with the live cells in a medium containing the substance to be incorporated in the cells.

**CONSTITUTION:** Live cells are perforated by irradiation with laser beams and then associated with a substance to be incorporated therein in a medium, e.g. a culture medium of the live cells, containing the substance to be incorporated therein. Thus, the above-mentioned substance is incorporated in the live cells, and holes are closed by the reparative function of the live cells to contain the substance in the holes of the live cells. A biopolymer, e.g. gene or protein, may be cited as the substance. The irradiation time of the laser beams must be adjusted not to kill the live cells in perforation by irradiation with the laser beams. As a means, the laser beams are shaped in the pulse form to limit the irradiation time.

